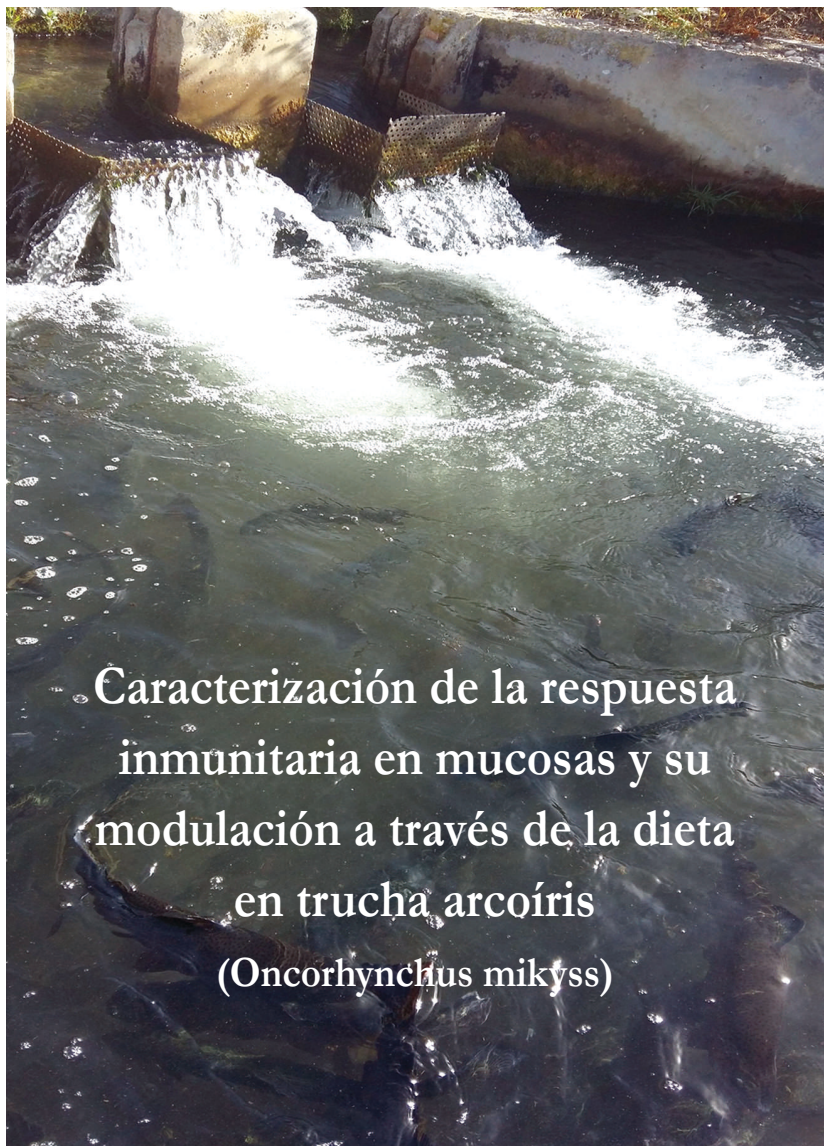




UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

Facultad de Veterinaria



Caracterización de la respuesta  
inmunitaria en mucosas y su  
modulación a través de la dieta  
en trucha arcoíris  
(*Oncorhynchus mykiss*)

Tesis doctoral presentada por  
Esther Leal Cebrián

Dirigida por  
Carolina Tafalla Piñeiro  
Aitor González Granja

Madrid, 2017

Tesis doctoral

Esther Leal Cebrián

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización de la respuesta inmunitaria en mucosas y su  
modulación a través de la dieta en trucha arcoíris  
(Oncorhynchus mykiss)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Esther Leal Cebrián**

**Directores**

**Carolina Tafalla Piñeiro  
Aitor González Granja**

**Madrid, 2018**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria



# Caracterización de la respuesta inmunitaria en mucosas y su modulación a través de la dieta en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Tesis doctoral presentada por:

Esther Leal Cebrián

**Directores:**

Carolina Tafalla Piñeiro

Aitor González Granja

Madrid, 2017







Memoria presentada por Esther Leal Cebrián para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid, 2017.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el grupo de Inmunología y Patología de peces, en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ha sido financiado por fondos privados a través del contrato CON14-122 entre el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria y *el Skretting Aquaculture Research Centre* (Skretting ARC, Noruega).



Carolina Tafalla Piñeiro, científico titular y Aitor González Granja, contratado doctor, del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización de la respuesta inmunitaria en mucosas y su modulación a través de la dieta en trucha arcoíris” que presenta Dña. Esther Leal Cebrián para optar al Grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada en el grupo de Inmunología y Patología de peces del CISA-INIA bajo su dirección, y que reuniendo los requisitos exigidos y considerando que está concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman el presente informe en Madrid a 11 de mayo de 2017.

Fdo. Carolina Tafalla Piñeiro

Fdo. Aitor González Granja



# Agradecimientos





Durante esta etapa son muchas las personas que han aportado su granito de arena en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado.

Debo empezar por mis directores, a la Doctora Carolina Tafalla por la formación recibida, por confiar en mí, y por abrirme las puertas de su maravilloso laboratorio y al Doctor Aitor González por su paciencia infinita, por su motivación y por amenizar los días intensos.

A la empresa Skretting, y principalmente a Carlos Zarza por la financiación y por su implicación para que este trabajo pudiera culminarse con éxito.

Mis compañeros también tienen un hueco entre estas páginas por enseñarme lo que es el compañerismo y prestarme su ayuda. Por compartir largas horas de laboratorio entre risas y llantos, pero siempre juntos. Por esas matanzas infernales, donde 3 no eran multitud, ni 4 ni 5...; sino al contrario, el roce hace el cariño, o eso dicen... Por esos cafés repletos de gallegadas, de tartas y bizcochos, por los Stroopwafel, por ese salmorejo, por el pan tostadito con aceite y sal, por esa tarta de zanahoria que nunca comimos, y sobre todo nuestras ganas de cambiar el mundo, os echaré de menos compys.

A esos amigos que día a día han estado junto a mí dándome su cariño. Gracias por enseñarme que Madrid no sólo es una ciudad caótica y estresante, sino que tiene rinconcitos con mucho encanto. No puedo dejarme a esa pareja tan especial (Dani y María), que se ha volcado en mí, gracias a ellos todo ha sido más fácil en Alalpardo VS Valdeolmos village.

Las últimas líneas son para mi familia, esas personas que han mostrado su apoyo incondicional durante todo el tiempo y me han alentado a conseguir mis metas a cambio de muchos kilómetros y ausencias. Gracias Papá por esos momentos de fuerza que me has transmitido y por enseñarme a luchar para conseguir mis sueños, sé que estarás conmigo siempre. A mi iaia, porque debe ser difícil separarte de tu nieta sin entender por qué. A Edgar, por su comprensión y por soportarme en la recta final, te prometo que la espera merecerá la pena. A mi hermana, por su entereza en las adversidades y mostrar su mejor sonrisa aun cuando su corazón se derrumba. A ti Mamá, mujer luchadora y con gran fuerza que siempre has antepuesto nuestro bienestar al tuyo. Deciros Mamá y *Sisti* que esto también es vuestro premio.

Hoy puedo cerrar este libro para hacer otro pájaro de barro y echarlo a volar.



# Resumen



El impacto de las enfermedades infecciosas en acuicultura continúa siendo uno de los factores limitantes para el crecimiento de este sector productivo. Por este motivo, es necesaria la búsqueda de tratamientos inmunoestimulantes que incrementen la respuesta inmunitaria de los peces y los hagan más resistentes a los patógenos. Así mismo, otra de las grandes demandas del sector es la optimización de vacunas de administración masiva, tanto por baño como por vía oral. En ambos casos, las mucosas (tejidos que se encuentran en contacto directo con el medio externo) juegan un papel principal en la activación de la respuesta inmunitaria, pero por el momento no se han esclarecido los mecanismos de regulación inmune de estos tejidos.

En esta Tesis Doctoral hemos caracterizado la distribución del sistema inmunitario en la piel de trucha arcoíris, para posteriormente analizar su regulación en respuesta a una infección viral, comparándola con la respuesta generada en un órgano linfóide secundario central como el bazo. En este estudio, hemos demostrado que la piel es un tejido rico en células T y que éstas no se distribuyen homogéneamente, sino que se encuentran en mayor concentración en la zona adyacente a las branquias, presentando las células B un perfil semejante. Asimismo, hemos visto como, en respuesta a una infección con el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), las células T se activan a nivel local sugiriendo que la piel puede actuar en los peces como un órgano linfóide secundario.

Posteriormente, hemos analizado como se modula la respuesta inmunitaria tanto en mucosas como en órganos linfoides centrales en peces alimentados con una dieta suplementada con distintos inmunoestimulantes y vitaminas, comparando los efectos producidos tras 15 días de administración con los observados tras 30 días. Este trabajo muestra como la modulación de la respuesta inmunitaria es posible mediante piensos suplementados, obteniéndose no sólo diferencias a nivel transcripcional en los distintos tejidos, sino también incrementando el título de anticuerpos naturales en el suero y disminuyendo la carga viral tras una infección con VHSV.

Por último, quisimos profundizar en los mecanismos inmunitarios regulados por una de las sustancias contenidas en la dieta suplementada Protec<sup>TM</sup>, la vitamina C. Para ello, estudiamos los efectos de dicha vitamina en una línea celular establecida de monocitos/macrófagos de trucha (RTS11) y en leucocitos de trucha *in vitro*. Los efectos potenciadores de la vitamina C sobre la producción de radicales de oxígeno, la capacidad fagocítica y la producción de factores pro-inflamatorios y antimicrobianos podría explicar la mejor respuesta antibacteriana que se observa en animales alimentados con dietas suplementadas con esta vitamina.





The impact of infectious diseases on aquaculture remains one of the limiting factors for the growth of this productive sector. For this reason, the search of immunostimulatory treatments that increase the immune response of fish and make them more resistant to pathogens is paramount. Similarly, another great demand of the sector is the optimization of vaccines that can be massively administered, either by bath or orally. In both cases, the mucosal surfaces (tissues that are in direct contact with the external environment) play a major role in the activation of the immune responses. However, so far, the mechanisms regulating the immune functionality of these tissues have not been clarified.

In this doctoral thesis we have characterized the distribution of the immune system along the skin of rainbow trout, and its regulation in response to a viral infection, comparing it to the response generated in a secondary lymphoid organ such as the spleen. We have established that the teleost skin is a tissue rich in T cells, and that the distribution of these cells throughout the fish epidermis is not homogenous, as the anterior skin sections are enriched in T cells, showing a similar pattern for B cells. We have also provided strong evidence that demonstrates that skin T cells respond to a viral infection with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) at very early time points, suggesting that the fish skin acts as a secondary lymphoid organ.

Subsequently, we have studied how the immune response is modulated in mucosal tissues and lymphoid organs of fish fed with a diet supplemented with different immunostimulants and vitamins, comparing the effects produced after 15 or 30 days of administration. We have shown the modulation of the immune response through the supplemented diet, obtaining not only transcriptional differences in different tissues, but also increasing titers of natural antibodies in serum and decreasing viral titers after an infection with VHSV.

Finally, we wanted to investigate the immune mechanisms regulated by one of the components of the Protec<sup>TM</sup> diet, vitamin C. To carry this out, we studied the effects of vitamin C on a cell line of trout monocytes/macrophages (RTS11) and on trout leukocytes *in vitro*. The positive effects of vitamin C on the production of oxygen radicals, the phagocytic capacity and the production of pro-inflammatory and antimicrobial factors of these cells seems to explain the improved antibacterial response observed in fish fed with a diet supplemented with this vitamin.



# Índice



<b>Introducción.....</b>	<b>23</b>
1.1. La importancia actual de la acuicultura .....	25
1.2. Principales enfermedades en la acuicultura .....	25
1.2.1. Enfermedades causadas por bacterias.....	26
1.2.2. Enfermedades causadas por virus.....	26
1.2.2.1. El virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) .....	26
1.2.2.2. Otros virus de salmónidos.....	29
1.2.3. Enfermedades causadas por parásitos.....	30
1.2.4. Enfermedades causadas por hongos.....	31
1.3. Métodos de prevención y tratamiento frente a patógenos en acuicultura.....	31
1.3.1. Profilaxis .....	31
1.3.2. Vacunas .....	33
1.3.3. Tratamientos .....	35
1.4. Modulación de la respuesta inmunitaria a través de la dieta .....	36
1.5. El sistema inmunitario de teleósteos .....	39
1.5.1. Órganos linfoides primarios .....	40
1.5.1.1. Timo.....	40
1.5.1.2. Riñón .....	41
1.5.2. Órganos linfoides secundarios .....	41
1.5.2.1. Bazo .....	41
1.5.3. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) .....	42
1.5.4. Células del sistema inmunitario innato .....	44
1.5.4.1. Monocitos y macrófagos .....	44
1.5.4.2. Leucocitos polimorfonucleares (PMNs) .....	47
1.5.4.3. Células dendríticas .....	48
1.5.4.4. Trombocitos .....	49
1.5.5. Células del sistema inmunitario adaptativo .....	49
1.5.5.1. Células B .....	50

1.5.5.2. Células T.....	51
1.5.5.3. Células NK.....	54
1.5.6. Citoquinas.....	54
1.5.6.1. Interleuquinas .....	55
1.5.6.2. Quimioquinas .....	56
1.5.6.3. Interferones.....	57
1.5.6.4. Otras citoquinas .....	59
1.5.7. Otros factores solubles.....	61
<b>Objetivos.....</b>	<b>65</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>69</b>
3.1. Animales .....	71
3.2. Líneas celulares .....	71
3.3. Virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) .....	72
3.4. Obtención de tejidos de trucha.....	73
3.5. Obtención de cultivos primarios de leucocitos de trucha.....	73
3.6. Inmunohistoquímica .....	74
3.7. Tratamientos y diseños experimentales .....	75
3.7.1. Vitamina C .....	75
3.7.2. Infecciones experimentales con VHSV .....	76
3.7.3. Ensayos de actividad de dietas funcionales .....	76
3.8. Estudios de transcripción génica.....	77
3.8.1. Aislamiento de ARN.....	77
3.8.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) .....	78
3.8.3. PCR a tiempo real .....	78
3.9. Técnicas de citometría de flujo .....	80
3.9.1. Cuantificación de células CD8 <sup>+</sup> en piel .....	80
3.9.2. Fagocitosis .....	80
3.9.3. Ensayos de quimiotaxis a CK9 .....	81
3.10. Otros ensayos inmunitarios.....	81



3.10.1. Estallido respiratorio .....	81
3.10.2. Detección de anticuerpos.....	82
3.11. Análisis estadísticos.....	83
<b>Capítulo I.....</b>	<b>85</b>
4.1. Introducción .....	87
4.2. Resultados .....	88
4.2.1 Transcripción de quimioquinas en la piel.....	88
4.2.2. Transcripción de inmunoglobulinas en la piel.....	89
4.2.3. Transcripción de genes relacionados con la inmunidad de las células T en la piel.....	90
4.2.4. Distribución de las células T en la piel.....	92
4.2.5. Comparación de los niveles de transcripción de células T en piel y bazo .....	93
4.2.6. Efectos de VHSV en la transcripción de genes relacionados con células T en la piel....	95
4.2.7. Efectos de VHSV en la transcripción de genes relacionados con células T en el bazo..	97
4.2.8. Distribución de algunos tipos celulares en rodaballo .....	98
4.3. Discusión .....	99
<b>Capítulo II .....</b>	<b>103</b>
5.1. Introducción .....	105
5.2. Resultados .....	106
5.2.1. Factor de condición .....	106
5.2.2. Efecto de la dieta en la transcripción de IgM en riñón, intestino, branquia y piel ....	107
5.2.3. Efecto de la dieta en la expresión de IgT en riñón, intestino, branquia y piel .....	107
5.2.4. Niveles de transcripción de IgD en riñón, intestino, branquia y piel .....	110
5.2.5. Niveles de transcripción de Mx en riñón, intestino, branquia y piel.....	110
5.2.6. Niveles de transcripción de IFN1 en riñón, intestino, branquia y piel .....	113
5.2.7. Niveles de transcripción de IFN- $\gamma$ en riñón, intestino, branquia y piel .....	113
5.2.8. Niveles de transcripción de IL-8 en riñón, intestino, branquia y piel.....	116
5.2.9. Niveles de transcripción de perforina en riñón, intestino, branquia y piel.....	116

5.2.10. Efecto de Protec™ en la carga viral tras la infección con VHSV.....	119
5.2.11 Efecto de Protec™ en los niveles de anticuerpos naturales de suero .....	120
5.3. Discusión .....	121
<b>Capítulo III.....</b>	<b>125</b>
6.1. Introducción .....	127
6.2. Resultados .....	128
6.2.1. Evaluación de la citotoxicidad de la vitamina C .....	128
6.2.2. Efecto de la vitamina C en el estallido respiratorio de RTS11 y de leucocitos de riñón .....	129
6.2.3. Efecto de la vitamina C en la capacidad fagocítica de RTS11 y leucocitos de riñón ...	130
6.2.4. Efectos de la vitamina C en la expresión de MHCII en la superficie de RTS11 y leucocitos de riñón .....	136
6.2.5. Efectos de la vitamina C en la migración hacia CK9 de células RTS11 y leucocitos de riñón .....	137
6.2.6. Efectos de la vitamina C en la respuesta transcriptómica de RTS11 y leucocitos de riñón tras una exposición bacteriana .....	138
6.3. Discusión .....	141
<b>Discusión general.....</b>	<b>145</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>151</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>155</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>181</b>
10.1. Anexo I: Abreviaturas .....	183
10.2. Anexo II: Índice de figuras .....	187
10.3. Anexo III: Índice de tablas .....	191
10.4. Anexo IV: Lista de publicaciones .....	193

# Introducción



## 1.1. La importancia actual de la acuicultura

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) define la acuicultura como el cultivo de organismos acuáticos, entre los que se incluyen peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. La acuicultura no es una actividad reciente, ya que existen evidencias de que en el año 460 a.C. en China se llevaba a cabo el cultivo de moluscos. Quince años más tarde, en este mismo país, Fan Lei redactó el primer tratado sobre acuicultura relacionado con la cría de carpa (*Ciprinus carpio*). En el caso de la trucha común (*Salmo trutta*), fue en el siglo XVIII cuando se consigue la reproducción artificial de esta especie; aunque no fue hasta un siglo después cuando aparecieron los primeros cultivos integrales. A lo largo del tiempo, la producción de la acuicultura ha ido superando a la obtenida a través de la pesca, produciéndose un incremento notable en los últimos 20 años. También la diversidad de especies cultivadas en acuicultura ha ido incrementándose en estos últimos años. Un informe de la FAO en 2012 registró la explotación de 567 especies entre las que se encuentran 354 especies de peces, 102 de moluscos, 59 de crustáceos, 6 entre anfibios y reptiles, 9 de invertebrados acuáticos y 37 especies de algas marinas y de agua dulce. Por tanto, la acuicultura es una actividad de elevada importancia económica para la obtención de diferentes especies acuícolas, manteniendo la sostenibilidad del medio marino y dulce. En Europa destaca la producción de especies como el salmón atlántico (*Salmo salar*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) o el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). En el caso de España, las principales especies producidas son el mejillón, seguido muy de cerca por la dorada y lubina, mientras que en la acuicultura continental, la trucha arcoíris es la especie con mayor producción.

## 1.2. Principales enfermedades en la acuicultura

Uno de los principales problemas de la acuicultura es el impacto de las enfermedades infecciosas. La elevada densidad poblacional genera en los peces un estrés crónico que junto a la elevada carga de materia orgánica que se acumula en el medio y la disminución de la concentración de oxígeno, propician problemas de salud en los peces incrementando su susceptibilidad a los patógenos. Entre los patógenos que afectan comúnmente a peces cultivados se encuentran virus, bacterias, parásitos y hongos.

### 1.2.1. Enfermedades causadas por bacterias

Pese a que las enfermedades bacterianas pueden ser controladas mediante el uso de antibióticos autorizados como por ejemplo la estreptomina, oxitetraciclina, o la eritromicina, el uso desproporcionado y extendido de los antibióticos ha llevado a la generación de resistencias microbianas, lo cual hoy en día constituye un grave problema. Es por este motivo que recientemente se han implementado regulaciones más estrictas respecto al uso de antibióticos en acuicultura y a la presencia de trazas de antibiótico en productos derivados de la acuicultura. Por esta razón, es necesario prevenir y tratar las enfermedades bacterianas por medios alternativos.

Algunas de las enfermedades más comunes causadas por bacterias son la enfermedad de la boca roja producida por la bacteria Gram negativa *Yersinia ruckeri*; la furunculosis, cuyo agente causante es la bacteria Gram negativa *Aeromonas salmonicida*; o lactococcosis causada por la bacteria Gram positiva *Lactococcus garvieae*.

### 1.2.2. Enfermedades causadas por virus

Las patologías de origen vírico son una grave amenaza para la acuicultura debido a la falta de tratamientos eficaces, y porque pueden llegar a provocar grandes mortalidades. Por estos motivos, las enfermedades de peces de declaración obligatoria por la Unión Europea, así como las englobadas en la antigua lista A de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), son en su gran mayoría de origen vírico.

#### 1.2.2.1. El virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)

El grupo más numeroso de virus que afecta a peces se encuentra dentro de la familia *Rhabdoviridae*. Dentro de este grupo, los dos virus con mayor incidencia en la acuicultura a nivel mundial son el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV, del inglés *viral hemorrhagic septicemia virus*) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV, del inglés *infectious hematopoietic necrosis virus*). Éste grupo también abarca el virus de la septicemia primaveral de la carpa (SVCV, del inglés *spring viraemia of carp virus*), que aunque no está incluido dentro de los virus de declaración obligatoria, ya que se considera endémico en Europa, constituye un grave problema para el cultivo de la carpa.



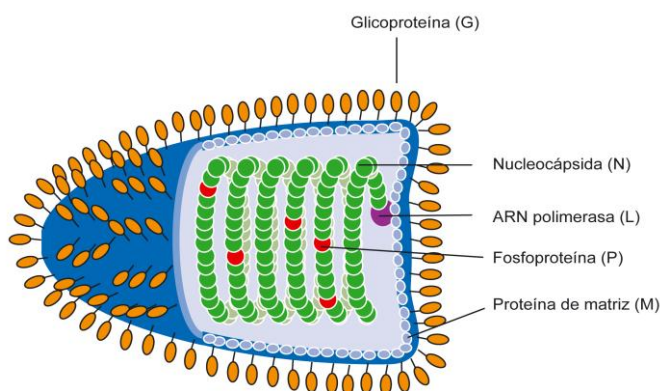
El VHSV se aisló por primera vez en 1963 en Dinamarca a partir de trucha arcoíris (Jensen, 1965). Principalmente afecta a salmónidos como la trucha arcoíris, trucha común, el salmón atlántico o el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), aunque también se ha aislado de más de 65 especies de peces del hemisferio norte tanto de agua dulce como salada, incluyendo el rodaballo. El VHSV está incluido como virus de declaración obligatoria por la OIE y la Unión Europea (Real Decreto, 1614/2008). Se creía confinado en Europa, pero a partir del año 2003 se considera de distribución mundial. Basándose en el análisis de secuencias de su genoma, se identifican 4 genotipos principales (Einer-Jensen et al., 2004; Snow et al., 2004), aunque parecen correlacionarse mejor con su localización geográfica que con su reactividad serológica (Gagne et al., 2007). Estos genotipos son los siguientes:

- Genogrupo I: lo constituyen cepas de agua dulce aisladas de peces en Europa, virus aislados de peces marinos de alrededor de Europa y en trucha arcoíris de aguas salobres en Finlandia.
- Genogrupos II y III: son endémicos de especies silvestres marinas encontradas en las costas de Europa. Dichas cepas han originado una mortandad baja o nula en trucha arcoíris (Dixon et al., 1997; Follett et al., 1997; Mortensen et al., 1999; Skall et al., 2004).
- Genogrupo IV: endémico de poblaciones de peces silvestres marinas localizadas a lo largo de la costa del Pacífico, en Norteamérica y Japón (subgrupo IVa). Unos años atrás se aisló en la región de Grandes Lagos otro subgrupo de este genotipo denominado IVb (Elsayed et al., 2006). Un tercer subgrupo conocido como IVc fue aislado en trucha común localizada en la costa Atlántica de Canadá (Gagne et al., 2007).

En España se declararon varios brotes de VHSV a finales de los años 80 y 90 que afectaron principalmente a salmónidos cultivados, provocando enormes pérdidas económicas debido a las altas mortalidades con las que cursaron (Basurco and Coll, 1992). En la actualidad, aunque no todas las cuencas se han declarado de forma oficial como zona libre de VHSV, se considera que nuestro país se encuentra libre de este virus.

El VHSV es un virus envuelto cuyo genoma es una molécula de ARN de polaridad negativa. Al igual que otros rabdovirus, es morfológicamente similar a una bala, y sus dimensiones alcanzan aproximadamente 180 x 70 nm. Podemos distinguir una nucleocápsida interna de simetría helicoidal empaquetando la molécula de ARN y una envuelta lipídica donde se observan espículas formadas por la glicoproteína vírica.

Su genoma codifica para 6 proteínas: una nucleoproteína (N), dos proteínas de matriz (P y M), una glicoproteína (G), la ARN polimerasa (L), y una proteína no estructural (Nv). La nucleoproteína N de 38-42 kDa es la proteína mayoritaria y forma la nucleocápsida que empaqueta el ARN genómico. La proteína estructural G es una glicoproteína de 72-80 kDa que forma las espículas triméricas localizadas en la membrana del virus (Fig. 1). Es la proteína responsable de la unión del virus a su receptor celular y la única frente a la cual, se generan anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la entrada del virus. La proteína no estructural Nv es característica del género *Novirhabdovirus* que agrupa a los rabdovirus acuáticos, distinguiéndolos de los rabdovirus terrestres. Aunque no han sido definidas sus funciones, parece que juega un papel importante en la patogénesis y la replicación viral (Biacchesi et al., 2000; Thoulouze et al., 2004). La proteína L es la polimerasa de ARN que tiene actividad tanto de transcriptasa como de replicasa (Barik et al., 1990; Conzelmann et al., 1990).



**Figura 1. Estructura del VHSV.** Representación gráfica del VHSV en el que se pueden diferenciar las proteínas que lo forman.

El VHSV afecta a peces de todas las edades, siendo más susceptibles los alevines. Los brotes más frecuentes se dan a 10°C, pero el virus permanece infeccioso en un rango de temperatura de 4-18°C (Meier et al., 1994). Su transmisión es horizontal, por contacto o por vía oral tras la ingestión de peces infectados (Ahne, 1982). Aunque no existe transmisión vertical, se ha detectado en la superficie del huevo (Neukirch, 1986), por lo que otra vía de transmisión horizontal es a través del fluido ovárico (Chaves-Pozo et al., 2010). Pese a que años atrás se consideraba que el virus se introducía desde el agua a través de las branquias y el intestino (Chilmonczyk et al., 1995), posteriormente se demostró que la principal vía de entrada es la base de las aletas (Harmache et al., 2006).

La enfermedad producida por el VHSV se caracteriza por la presencia de hemorragias generalizadas en todo el cuerpo, observándose además un comportamiento anormal de la natación. Otros síntomas habituales son oscurecimiento corporal, exoftalmia, palidez de las branquias, abdomen hinchado y ascitis (Fig. 2). Internamente, se visualizan hemorragias en el tejido graso, intestino, hígado, vejiga natatoria y musculatura.



**Figura 2. Signos clínicos de la enfermedad provocada por el VHSV en trucha arcoíris.** Comparación de una trucha sana (arriba) y una trucha infectada con VHSV por baño (abajo), donde se pueden observar algunos signos externos de la infección como exoftalmia, hemorragias y abdomen hinchado.

#### 1.2.2.2. Otros virus de salmónidos

Otro rabdovirus similar al VHSV es IHNV. Este virus produce una enfermedad aguda y muy contagiosa pudiendo llegar a provocar mortalidades del 100% (Wolf, 1988), afectando exclusivamente a salmónidos. Entre sus síntomas destacan periodos de letargo mezclados con actividad frenética y necrosis en sus órganos hematopoyéticos (Bootland y Leong, 1992). La enfermedad se describió por primera vez en Estados Unidos en 1944, y aunque en España hubo una alerta en 2005 no se han vuelto a notificar nuevos aislamientos.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, del inglés *infectious pancreatic necrosis virus*) fue aislado por primera vez en Norteamérica en 1957 de la trucha arcoíris (Wolf y Quimby, 1971). Incluido dentro de la familia *Birnaviridae* y el género *Aquabirnavirus*, IPNV es un virus ARN de doble cadena sin envuelta lipídica y con una cápsida de simetría icosaédrica de aproximadamente 60 nm de diámetro. Afecta principalmente a salmónidos aunque también ha sido encontrado en rodaballo (Castric, 1997), lucio (*Esox lucius*) e incluso crustáceos y moluscos.

Como ocurre en la mayoría de los virus de peces, los primeros signos clínicos son inespecíficos. Cuando alcanzan los 6 meses de edad, aquellos animales infectados o los supervivientes a esta enfermedad, suelen desarrollar una enfermedad crónica, siendo portadores asintomáticos. IPNV se transmite tanto verticalmente a la descendencia como horizontalmente a través de las heces o productos sexuales (Mulcahy y Pascho, 1984; Reno, 1999; Rodríguez et al., 1993; Rodríguez Saint-Jean et al., 2003).

El virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV, del inglés *infectious salmon anemia virus*) pertenece al género *Isavirus*, de la familia *Orthomyxoviridae*, presenta una envuelta y posee un genoma compuesto por ocho segmentos monocatenarios de ARN negativo. Es el causante de una enfermedad que afecta principalmente al salmón del Atlántico (Christie et al., 1988), aunque ha sido descrita en otras especies como la trucha común, carbonero (*Pollachius virens*) y en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (Mjaaland et al., 1997). Se transmite horizontalmente llegando a sobrepasar el 90% de mortalidad en los casos más graves. Afecta al riñón, hígado, intestino y branquias, siendo su actividad hemaglutinante su principal característica (Aspehaug et al., 2004; Kibenge et al., 2009; Mjaaland et al., 1997).

Otro virus de ARN de cadena simple perteneciente a la familia *Togaviridae* y género *Alphavirus*, denominado alfavirus de salmón (SAV, del inglés *salmon alphavirus*) es el causante de la enfermedad del páncreas (PD, del inglés *pancreas disease*). En los cuadros agudos los principales signos clínicos son la pérdida repentina del apetito, letargia e incremento de la mortalidad, a menudo precedido de un comportamiento alimenticio voraz (McLoughlin y Graham, 2007). En la presentación subaguda es posible observar peces letárgicos, incapaces de mantener el equilibrio, en el borde de las jaulas.

### 1.2.3. Enfermedades causadas por parásitos

Un parásito es un organismo que vive dentro o sobre otro organismo vivo del que obtiene nutrientes, dañando o causando enfermedades al organismo hospedador en la mayoría de los casos. Según la relación del parásito con el hospedador, es decir, si viven en la superficie del hospedador, si lo hacen en el interior, si sólo viven para alimentarse o permanecen en contacto con el hospedador siempre, se distinguen en ectoparásitos, endoparásitos, temporales y permanentes respectivamente.

Las enfermedades parasitarias más comunes en salmónidos son la Ichthyophthiriosis, comúnmente conocida como enfermedad del punto blanco, causada por el protozoo ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* y la enfermedad proliferativa del riñón (PKD, del inglés *proliferative*

*kidney disease*) causada por un endoparásito denominado *Tetracapsuloides bryosalmonae* que produce inflamación del riñón y el bazo, causando anemia severa. Por otro lado, se han descrito diversas especies de piojos de mar aunque la especie *Lepeophtheirus salmonis* es la que más afecta a salmónidos. Además del daño directo que produce en los peces infectados, las erosiones en la piel y aletas que provocan facilitan la entrada de otros patógenos.

#### 1.2.4. Enfermedades causadas por hongos

En peces encontramos algunas especies de hongos patógenos, siendo generalmente saprófitos que actúan como patógenos oportunistas, aprovechándose de lesiones previas en los tejidos. Los factores que determinan su aparición en el agua principalmente son la presencia de materia orgánica, la densidad de peces y la presencia de animales muertos o de huevos en descomposición. Suelen aparecer más frecuentemente a temperaturas bajas, ya que en estos casos la respuesta inmunitaria de los peces a las infecciones es menor. Son muy habituales las infecciones de frezas (huevos de peces) en periodo de incubación, invadiendo los huevos muertos y extendiéndose hasta asfixiar y matar a los huevos adyacentes.

*Saprolegnia parasitica* es el agente fúngico más importante en salmónidos. Presenta zoosporos con flagelos, se alimenta de células muertas y en algunos casos se instala en las agallas. Provoca heridas y necrosis en la epidermis, genera mucho estrés y en el caso de colonizar las branquias provoca insuficiencia respiratoria.

### **1.3. Métodos de prevención y tratamiento frente a patógenos en acuicultura**

#### 1.3.1. Profilaxis

La profilaxis o medicina preventiva tiene como objetivo reducir las probabilidades de aparición de enfermedades. En acuicultura, las principales causas de la aparición de enfermedades son la exposición a patógenos, una alimentación inadecuada y el estrés.

Los peces se encuentran expuestos a la alta carga microbiana del agua y a una alimentación excesiva, que eleva la cantidad de materia orgánica en el medio disminuyendo las concentraciones de oxígeno. Todo ello, junto con las condiciones de elevada densidad poblacional provoca en los animales un estrés crónico.

Por tanto, una de las primeras medidas a tener en cuenta para el control de enfermedades infecciosas es llevar a cabo un control exhaustivo de los parámetros físico-químicos del medio, así como de las condiciones sanitarias de los peces. En la actualidad, debido a la escasez de tratamientos eficaces autorizados es muy difícil combatir a los patógenos una vez se han introducido en una piscifactoría, y por lo tanto la profilaxis juega un papel imprescindible.

➤ Medidas zoonosanitarias: su objetivo es evitar el contacto del patógeno con el hospedador. El requisito indispensable para prevenir infecciones es evitar la posible entrada de animales enfermos y para evitarlo a nivel europeo se aprobó el Real Decreto 1614/2008 del 3 de Octubre de 2008, que regula los requisitos zoonosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, así como la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. Además también se han regularizado: la lista de terceros países desde los cuales está permitida la importación de determinados animales acuáticos (Reglamento 719/2009/CE); los programas de erradicación (Decisión 2009/946/CE); los requisitos de cuarentena de los animales de acuicultura (Decisión 2008/946/CE); y las directrices para los sistemas de vigilancia zoonosanitaria basados en el riesgo (Decisión 2008/896/CE). Parte del éxito de estos programas se debe a la rápida detección de los patógenos causantes de las enfermedades, combinando un diagnóstico precoz, estudios epizootiológicos y la prohibición de comercialización y/o desplazamiento de animales portadores ya sean huevos, alevines y/o adultos.

➤ Medidas higiénicas: tienen por objeto el control de factores perjudiciales para la salud. En este grupo se incluye la correcta eliminación de la materia orgánica, la determinación de la cuantía óptima así como de la composición del alimento, la eliminación de los cadáveres lo más pronto posible y el control de la densidad poblacional.

➤ Medidas ambientales: es necesario llevar un control exhaustivo de los parámetros físico-químicos del agua, no sólo para obtener una mayor productividad sino también para evitar enfermedades. La temperatura del agua es un factor crítico en el desarrollo de enfermedades, siendo especialmente importante su control en estaciones cálidas.

Otro factor a tener en cuenta es la concentración de oxígeno y los diferentes compuestos nitrogenados ( $\text{NO}^2$  y  $\text{NO}^3$  principalmente), ya que puede provocar mortalidades, siendo ésta una causa indirecta de la aparición de enfermedades. Se le suman a ambos factores otros como la salinidad, luz, evaporación, pH, turbidez, color, dióxido de carbono, alcalinidad y dureza.

### 1.3.2. Vacunas

La vacunación también constituye un método de profilaxis, ya que previene la aparición de la enfermedad. Debido a que los peces poseen sistema inmunitario adaptativo, la generación de protección mediante vacunación es posible. La vacuna ideal es aquella capaz de generar la misma respuesta inmunitaria a la producida por la infección real. Esta respuesta debe ser persistente a largo plazo para proteger frente a infecciones posteriores causadas por el mismo patógeno, y efectiva en estadios tempranos de la infección. Es deseable que no cause efectos secundarios y que desencadene la respuesta necesaria con una única dosis. Otros factores a tener en cuenta en la producción de la vacuna ideal es que sea fácil de transportar, estable y económicamente rentable. Asimismo, es fundamental que sea segura para el medio ambiente y para la salud del consumidor.

Si bien en peces existen numerosas vacunas comerciales frente a patógenos bacterianos, son muy reducidas las efectivas para virus o parásitos. Además, la gran mayoría de las vacunas comerciales que se administran de forma rutinaria en acuicultura se suministran mediante inyección intraperitoneal, lo que conlleva un elevado coste y generación de estrés en los peces. Debido a la singularidad de los peces, las rutas de administración de las vacunas para estos animales acuáticos debería permitir la vacunación de un gran número de animales de forma simultánea. La administración no sólo debe ser lo menos invasiva posible, sino que también es importante que sea viable administrarla en los primeros meses de vida de los peces cuando no es posible inyectar a los animales debido a su tamaño. Por estos motivos, es muy importante la optimización de rutas alternativas de vacunación como las llevadas a cabo mediante inmersión en una solución vacunal o a través de la administración oral junto al pienso.

Las vacunas orales tienen una serie de ventajas que las constituyen como el método idóneo. Son fáciles de administrar, no producen estrés en los peces, estimulan la inmunidad de las mucosas y los costes de producción son bajos (Lin et al., 2000; Vandenberg, 2004). Sin embargo, este tipo de vacunas tienen niveles de efectividad muy bajos y por el momento, las únicas vacunas orales que se comercializan sólo tienen efectividad como potenciadores (*boosters*) de vacunas administradas por inyección intraperitoneal o por baño. En este tipo de vacunación, es necesario llevar a cabo el recubrimiento del antígeno para evitar su destrucción en el estómago.

Como métodos de recubrimiento del antígeno, se han testado distintos tipos de encapsulaciones consistentes en microesferas de diferentes materiales, como liposomas, biofilms o alginato (Guliyeva et al., 2006; Lin et al., 2005; Rodrigues et al., 2006; Romalde et al., 2004; Tian et al., 2008a; Tian et al., 2008b; Wong et al., 1992). Los tipos de vacunas que existen en la actualidad frente a patógenos de peces son las siguientes:

➤ Vacunas inactivadas: se componen de microorganismos inactivados térmica o químicamente incapaces de reproducirse y por tanto, incapaces de producir la enfermedad. Son muy comunes en acuicultura para patógenos bacterianos. La bacteria inactivada, se administra intraperitonealmente junto con adyuvantes (potenciadores de la respuesta inmunitaria) oleosos que retardan su eliminación en el interior del pez (Gudding et al., 1999). En el caso de los virus, las vacunas inactivadas suelen tener una baja inmunogenicidad. Existen algunas vacunas de este tipo comercializadas frente a virus como IPNV, pero su efectividad en infecciones de campo es muy limitada (Rodríguez Saint-Jean et al., 2003).

➤ Vacunas atenuadas: son aquellas en las que el microorganismo está vivo y tiene capacidad replicativa, estimulando así una respuesta celular y humoral (Marsden et al., 1996), pero con una infección inaparente o con sintomatología mínima. Estas vacunas son fáciles de suministrar y se administran en dosis bajas debido a la posterior diseminación del patógeno en los individuos vacunados. El problema del uso de este tipo de vacunas en acuicultura es su posible diseminación incontrolada, además de necesitar un estricto control de la posible reversión del patógeno. Por esta razón, su uso no está permitido en acuicultura.

➤ Vacunas recombinantes: son aquellas que contienen un preparado de subunidades antigénicas que pueden ser de distinta naturaleza como lipopolisacáridos, extractos ribosómicos, o proteínas purificadas o sintetizadas químicamente. Se suelen emplear cuando han sido aislados los componentes responsables de la inmunogenicidad del agente infeccioso. Al no contar con el patógeno entero, se evita el riesgo de desencadenar la enfermedad tras la vacunación.

Su producción es sencilla, eficiente y barata y en el caso de los virus se basa en la obtención de proteínas víricas mediante la producción del correspondiente ADN recombinante, capaces de inducir inmunidad y protección en el animal. Las proteínas antigénicas identificadas se pueden obtener a partir de los genes virales clonados en una gran variedad de vectores y sistemas de expresión. Una variación dentro de la producción de vacunas recombinantes, en el caso de algunos virus no envueltos, sería la posibilidad de formar cápsidas vacías (VLPs, del inglés *virus-like particles*), basándose en el hecho de que las



proteínas de la cápsida de algunos virus se agregan de forma natural para formar partículas virales (Dhar et al., 2014). Estas partículas son idénticas al virus, aunque no son infecciosas por no contar con la presencia de material genético.

➤ Vacunas ADN: están basadas en la administración de un plásmido de expresión eucariota que codifica para una proteína patógena, y que puede expresar el antígeno eficazmente y con una adecuada conformación dentro del hospedador (Leong et al., 1997). Dado que el antígeno se produce en el interior de las células eucariotas, estas vacunas son capaces de estimular el sistema inmunitario de la misma manera que una infección viral, siendo muy efectivas frente a algunos virus tales como VHSV o IHNV. Además, estas vacunas son completamente seguras para el hospedador, no provocan efectos secundarios y son muy estables y fáciles de producir. Sin embargo, por el momento este tipo de vacunas no están autorizadas en Europa ya que existen dudas acerca de si los peces vacunados podrían ser considerados peces transgénicos al existir riesgo de que el ADN vacunal se integre en el genoma del pez.

En cualquier caso, mientras se desconozcan los mecanismos inmunitarios mediante los cuales se adquiere protección, el diseño de vacunas eficaces continuará siendo un ejercicio de ensayo-error. Por lo tanto, es imprescindible continuar investigando en la regulación del sistema inmunitario en peces, especialmente en mucosas, si queremos llegar a optimizar vacunas que se puedan administrar de forma masiva.

### 1.3.3. Tratamientos

Existen numerosos compuestos químicos que se disuelven en el agua con propiedades desinfectantes, antifúngicas o antibacterianas. Algunos de los desinfectantes más utilizados en acuicultura incluyen compuestos yodados, cloro, alcoholes y sales de amonio (Amend y Wedemeyer, 1970; Inouye et al. 1990).

La adición de sal en el agua también puede ser útil para evitar las enfermedades causadas por bacterias y parásitos, realizando baños de 10 minutos con 1% de sal. Para la prevención de la aparición de parásitos el tratamiento más utilizado era el vertido de formol en dosis controladas al tanque, aunque a partir de 2015 el formol se prohibió debido a los problemas medioambientales que producía. También existen algunos fungicidas comerciales para uso en acuicultura como por ejemplo, el permanganato de potasio al 1% o el yoduro de potasio al 0.5%.

Por otro lado, el uso de antibióticos en acuicultura está cada vez más regularizado debido al riesgo que conlleva: la liberación de antibióticos al medio ambiente; su posible llegada a los seres humanos a través de los productos de la acuicultura; o la generación de cepas resistentes. Además, uno de los problemas más importantes en la acuicultura es la falta de tratamientos frente a virus, ya que hasta el momento, no existen tratamientos antivirales autorizados para uso en acuicultura. Por todos estos motivos, es esencial explorar métodos de tratamiento y prevención alternativos para proteger a los peces frente al impacto de las enfermedades infecciosas.

#### **1.4. Modulación de la respuesta inmunitaria a través de la dieta**

Como todos los animales, los peces también deben consumir los nutrientes necesarios para crecer, reproducirse y mantener un buen estado de salud. Así, las deficiencias nutricionales pueden provocar deformaciones, problemas en el crecimiento, enfermedades, e incluso si las deficiencias son muy severas, la muerte. La mayoría de los animales tienen requerimientos nutritivos similares, ya que necesitan aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales, pero la cantidad de cada nutriente varía dependiendo de la especie y de la etapa de la vida en la que se encuentre.

Actualmente, en la acuicultura, existe un gran interés por las dietas suplementadas con sustancias inmunomoduladoras o inmunoestimulantes que mejoren el estado inmunitario de los peces y los hagan más resistentes a enfermedades. Se entiende por sustancia inmunoestimuladora, aquella que potencia el sistema inmunitario incrementando la resistencia del hospedador frente a enfermedades (Bricknell y Dalmo, 2005). Por otro lado, la sustancia inmunomoduladora es aquella que modifica (incrementando o disminuyendo) la capacidad del sistema inmunitario para realizar alguna de sus funciones.

Generalmente, los inmunoestimulantes en acuicultura se incluyen como suplementos dietéticos en momentos puntuales, siendo especialmente importante su administración en aquellas etapas de la producción en las que los peces sufren un mayor estrés, coincidiendo con los momentos que requieren el manejo de los peces, ciclos de vacunación o durante fases importantes del desarrollo (Dhanasiri et al., 2012). Los inmunoestimulantes son sustancias que pueden provenir de plantas, bacterias, virus, parásitos, ser compuestos sintéticos, hormonas o vitaminas (Lokesh et al., 2012; Zhou et al., 2011).

No sólo se han realizado dietas suplementadas para reducir el impacto de las enfermedades infecciosas, sino también para reducir los riesgos ante la presencia de productos químicos (Magnadottir, 2010), para aumentar el crecimiento y para favorecer la digestión, la absorción de nutrientes o el equilibrio intestinal (Dimitroglou et al., 2011; Harikrishnan et al., 2011; Heidarieh et al., 2012).

Los  $\beta$ -glucanos son unos de los immunoestimulantes más utilizados en acuicultura. Son un grupo de polímeros de glucosa que constituyen el principal componente estructural de las paredes celulares de plantas, hongos y algunas bacterias (Steele et al., 2003). Han sido administrados de manera oral en la dieta, mediante inyección peritoneal o como adyuvante en vacunas, obteniendo en todos los casos efectos positivos en el sistema inmunitario (Dalmo y Bogwald, 2008; Das et al., 2009; Kudrenko et al., 2009). La inclusión de  $\beta$ -glucanos en la dieta también ha demostrado ser beneficiosa para aumentar la resistencia frente a infecciones, como la causada por *Vibrio harveyi* (Ai et al., 2007) o *Aeromonas hydrophila* (El-Boshy et al., 2010).

Algunos minerales esenciales en la dieta de los peces son el selenio (Se), el hierro (Fe), el cobre (Co), el magnesio (Mg) y el zinc (Zn). El selenio interviene en la formación de la enzima glutathion peroxidasa que actúa junto a la vitamina E y C como agente antioxidante, protegiendo a las células del daño oxidativo en tejidos vitales. En mamíferos, se ha demostrado que el selenio es un elemento esencial en la nutrición ya que un déficit de éste puede provocar disfunciones fisiológicas volviendo al animal más susceptible a infecciones o estrés medioambiental (Hamilton, 2004; Rayman, 2000). En peces, se ha descrito que juega un papel importante en la respuesta inmunitaria, interviniendo en el estallido respiratorio, siendo importante la suplementación de la dieta con selenio en periodos de estrés (Sebastien y Rider, 2009). El zinc también tiene un cometido importante en el sistema reproductivo y el sistema inmunitario, actuando como cofactor de metaloenzimas e interviniendo en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

En peces, se han descrito problemas derivados de la deficiencia de zinc en la dieta (Ketola, 1979). En la Tabla 1 se exponen algunos de los immunoestimulantes comúnmente utilizados en acuicultura, especificando su origen y acompañados de referencias bibliográficas donde se describen sus efectos.

Origen	Tipo	Inmunoestimulante
<b>Natural</b>	Bacterias	Lipopolisacárido Peptidoglicano β-glucanos
	Plantas y animales	Propóleo Haliotis discus Watasemia scintillans
	Citoquinas y hormonas	Hormona del crecimiento Interferón Lactoferrina
	Nucleótidos	Oligonucleótidos CpGs ARN cadena doble
	Factores nutricionales	Vitaminas y minerales Lípidos Carbohidratos
	Polisacáridos	Quininas Quitosan
<b>Sintético</b>		Levamisol FK-565 Adyuvante de Freud

**Tabla 1. Lista de inmunoestimulantes utilizados comúnmente en acuicultura.** Clasificación de algunos inmunoestimulantes utilizados en acuicultura según su origen.

Las vitaminas también desempeñan funciones importantes en el crecimiento, mantenimiento, salud y reproducción de los peces. Éstos requieren 11 vitaminas hidrosolubles, 8 del complejo B que se precisan en pequeñas cantidades, y otras como la colina, inositol o el ácido ascórbico que se necesitan mayores cantidades. La vitamina C o ácido ascórbico es un antioxidante que juega un papel importante en el crecimiento e inmunidad del pez (Ibiyo et al., 2006; Peng et al., 2005). Suplementar la dieta con ácido ascórbico ejerce efectos positivos en diferentes parámetros inmunitarios, tales como la actividad de lisozima, actividad del complemento, estallido respiratorio de macrófagos y actividad natural citotóxica, mejorando finalmente la resistencia frente a cuadros de estrés y enfermedades (Dawood et al., 2016; Tewary y Patra, 2008; Xu et al., 2016a).

Por su composición bioquímica, las microalgas también se han incorporado en las dietas como fuente de sustancias inmunoestimulantes. Sin embargo, su uso no está muy extendido debido a que su inclusión en las dietas no es económicamente rentable por el momento, como consecuencia del elevado coste que conlleva su procesamiento (Atalah et al., 2007).

## 1.5. El sistema inmunitario de teleósteos

La respuesta inmunitaria en los vertebrados se ha dividido clásicamente en dos componentes: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa o adquirida. La respuesta innata es la primera línea de defensa contra la infección e incluye barreras físicas y respuestas humores y celulares. La respuesta adaptativa también incluye respuestas humores y celulares y se caracteriza por el reconocimiento específico del antígeno, favoreciendo una respuesta secundaria específica más rápida y más fuerte ante una subsiguiente exposición al mismo patógeno. En los últimos años, se ha visto que ambas respuestas se encuentran estrechamente relacionadas, de tal forma que muchas células/moléculas inicialmente asignadas a un tipo de respuesta, tienen funciones específicas en ambas.

Cuando el organismo se encuentra con un patógeno, en primer lugar es bloqueado por las distintas barreras físicas, las cuales incluyen el moco, las escamas o el epitelio. La capa mucosa reduce el avance del patógeno y lo inactiva mediante una gran variedad de agentes microbianos como lectinas, lisozimas, pentraxinas, factores de complemento, péptidos antibacterianos e inmunoglobulinas (anticuerpos naturales) que favorecen a la eliminación directa del agente infeccioso (Alexander y Ingram, 1992; Ellis, 2001). Si aun así el patógeno es capaz de penetrar el epitelio, se activa entonces una respuesta mediada por células que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern recognition receptors*) capaces de reconocer patrones moleculares característicos conservados en muchos microorganismos (PAMPs, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*). Al mismo tiempo, se activan las respuestas primarias de los linfocitos específicos de antígeno, encargados de expresar receptores variables capaces de reconocer moléculas del patógeno específicas, preparándose para una futura respuesta secundaria específica.

Los peces son el primer grupo evolutivo que consta de un sistema inmunitario completo; es decir, en el que se dan tanto respuestas innatas como adaptativas (DeLuca et al., 1983).

Sin embargo, la respuesta adaptativa en los peces es algo rudimentaria, y por lo tanto, estos animales siguen dependiendo en gran medida de los mecanismos inmunitarios innatos para protegerse frente a infecciones (Bly y Clem, 1991; Douglas et al., 2003).

El sistema inmunitario en los vertebrados superiores está compuesto por órganos linfoides primarios, que son aquellos que producen las células del sistema inmunitario, y los secundarios, encargados de generar la respuesta inmunitaria.

En mamíferos, el hígado fetal, el timo y la médula ósea constituyen los órganos linfoides primarios, y el bazo, nódulos linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, del inglés *mucosa-associated lymphoid tissue*) constituyen los órganos linfoides secundarios. En los peces, la organización de los órganos inmunitarios difiere de la de vertebrados superiores. Los peces carecen de médula ósea y es el riñón anterior el que adquiere la función hematopoyética principal, además del timo, encargado de la producción de linfocitos T. Tampoco contienen nódulos linfáticos, por lo que el bazo es el principal órgano secundario. Otra diferencia entre los vertebrados superiores y los peces es que en estos últimos, a pesar de haberse descrito la presencia de linfocitos B y T en las mucosas (branquias, fosas nasales, piel e intestino), no se han encontrado estructuras organizadas tales como las placas de Peyer de los mamíferos. Esto ha dado lugar a que algunos autores consideren que el tejido inmunitario asociado a mucosas no debería considerarse un verdadero MALT equivalente al descrito en mamíferos (Tafalla et al., 2016)

#### 1.5.1.Órganos linfoides primarios

##### 1.5.1.1. Timo

Es el órgano donde se producen y maduran los linfocitos T. Su estructura es similar a la de los mamíferos aunque en los teleósteos se localiza subcutáneamente en la comisura dorsal del opérculo. En alevines muy jóvenes, consta de una capa de células que aísla a los timocitos del agua; sin embargo, en ella aparecen poros que sugieren que podría haber contacto directo entre el antígeno externo y el órgano. Al alcanzar la madurez, se incrementa el número de células mucosas y desaparecen los poros (Chilmonczyk, 1983; Potter et al., 1998). En el timo encontramos dos poblaciones diferenciadas: las células epiteliales del timo y los timocitos linfoides, que son principalmente células T. Las células epiteliales del timo junto con otras células entre las que se incluyen las células mesenquimales, forman un nicho que favorece la diferenciación de células T.

Mediante la timectomización en truchas de diversas edades, se ha demostrado la implicación del timo en la respuesta celular y humoral frente a antígenos T-dependientes o T-independientes (Zapata, 1981).

#### 1.5.1.2. Riñón

En los teleósteos, el riñón es el principal órgano hematopoyético, es decir, el órgano en el que se producen las células de la sangre. Es un órgano complejo que se divide en cuatro partes con estructuras y funciones diferentes: la parte hematopoyética, el retículo-endotelial, la endocrina y la secretora. Se encuentra recorriendo el cuerpo del pez longitudinalmente, desde la cabeza hasta la mitad del pez, adherido a la columna vertebral. La parte anterior es lo que se conoce como riñón anterior o cefálico, que generalmente se bifurca en dos lóbulos, carece de nefronas y tiene función exclusivamente hematopoyética. La parte posterior, por otro lado, alberga tanto tejido renal como inmunitario (Grassi Milano et al., 1997; Zapata et al., 1995).

En el riñón se encuentran distintos tipos leucocitarios, incluyendo granulocitos, macrófagos, melanomacrófagos (células de tipo macrófago con gran acumulación de melanina en su interior), y células linfoides en todos sus estadios evolutivos, mayoritariamente células  $IgM^+$  (linfocitos B) (Irwin y Kaatari, 1986; Press et al., 1994). Mientras que las células reticulares proporcionan las interacciones necesarias para el funcionamiento de las células linfoides (Press et al., 1994), las células endoteliales de los sinusoides, debido a su capacidad de endocitosis, suponen el principal sistema de filtrado de la sangre (Dannevig y Berg, 1986). El primer órgano en el que aparecen células  $IgM^+$ , durante el desarrollo del pez es el riñón anterior, por lo que se le considera un órgano primario en la diferenciación de células B (Irwin y Kaatari, 1986). En trucha, se ha descrito la distribución de diferentes estadios de maduración de linfocitos B en las distintas regiones del riñón. Así, se ha visto que mientras que el riñón anterior contiene células B precursoras, en la parte posterior se localizan linfocitos B que se han diferenciado a células plasmáticas (Ye et al., 2011; Zwollo et al., 2008). Por todo ello, el riñón se ha descrito como un órgano análogo a la médula ósea de los mamíferos, en el que se produce la eritropoyesis, la granulopoyesis y la linfopoyesis (Razquin et al., 1990).

#### 1.5.2. Órganos linfoides secundarios

##### 1.5.2.1. Bazo

El bazo es un órgano compacto de color rojo oscuro, localizado en la cavidad peritoneal. En mamíferos, el bazo contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos y dos pulpas diferenciadas, una roja y otra blanca. La pulpa roja ocupa prácticamente todo el órgano y está constituida por una red de células sanguíneas, principalmente macrófagos y linfocitos.

La pulpa blanca la forman elipsoides, que son capilares con una delgada capa endotelial rodeados de retículo fibroso y acumulaciones de macrófagos. En peces, la pulpa blanca está poco desarrollada por lo que esta diferenciación no es claramente visible (Fänge, 1985). En esta parte se encuentran también abundantes centros melanomacrofágicos (CMMs), que constituyen acumulaciones de melanomacrófagos junto con otros tipos leucocitarios. El bazo tiene numerosas funciones pero las más importantes son la filtración de la sangre, la destrucción eritrocitaria, la presentación de los antígenos y la producción de anticuerpos. En sus paredes encontramos macrófagos que intervienen en la fagocitosis de antígenos. Tras esta captación inicial, el material es transferido a los CMMs (Espenes et al., 1995; Press y Lillehaug, 1995), principales filtradores del sistema vascular capaces de eliminar antígenos circulantes y células sanguíneas debilitadas (Espenes et al., 1995; Falk et al., 1995).

#### 1.5.3. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

Los leucocitos de peces no están presentes sólo en los órganos inmunitarios, sino que se han descrito en la mayoría de los tejidos, incluyendo el hígado, tracto digestivo, branquias, piel y gónadas (Abos et al., 2013; Ballesteros et al., 2013a; Chaves-Pozo et al., 2003). Estos linfocitos no están organizados en estructuras tan especializadas como las descritas en mamíferos (tales como las placas de Peyer del intestino de mamíferos). Por lo tanto, a pesar de que los autores se refieren comúnmente a estos tejidos como MALT, es probable que esta diferente distribución conlleve diferencias importantes en funcionalidad. Dependiendo de los órganos, la designación de estas estructuras linfoides varía, siendo GALT (del inglés *gut-associated lymphoid tissue*), la forma a la que se refiere en el intestino, GIALT (del inglés *gill-associated lymphoid tissue*) el presente en las branquias, NALT (del inglés *nasal-associated lymphoid tissue*) en las fosas nasales o SALT (del inglés *skin-associated lymphoid tissue*) el localizado en la piel.

El GALT en peces incluye linfocitos B y T tanto intraepiteliales (IEL, del inglés, *intraepithelial lymphocytes*) como localizados en la lámina propia (LP) (Rombout et al., 2011). Aunque en muchos estudios se han caracterizado diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria del intestino de teleósteos ante diversos patógenos o estímulos (revisado en (Rombout et al., 2011)), la mayoría de estos análisis se han enfocado exclusivamente en los segmentos posteriores. En algunos trabajos más recientes, se ha observado que en otros segmentos del tracto digestivo existen también poblaciones de leucocitos que responden eficazmente a la infección o a la vacunación oral.



Por ejemplo, en trucha arcoíris, se ha descrito una movilización de linfocitos T y B a la región de los ciegos pilóricos (zona intermedia del tracto intestinal) en respuesta tanto a vacunación como a una infección viral (Ballesteros et al., 2013a; Ballesteros et al., 2013b).

Como ocurre en otras mucosas, las células epiteliales del intestino están protegidas por una capa de mucus que actúa como barrera física y química que ayuda a la osmorregulación y proporciona lubricación (Gomez et al., 2013). La composición química del mucus del intestino de los teleósteos difiere de la de humanos (Allen et al., 1983), siendo un 95% agua y un 5% de glicoproteínas, principalmente mucinas, las que le confieren viscosidad. También contiene factores inmunitarios innatos y adaptativos como por ejemplo moléculas antimicrobianas e inmunoglobulinas secretadas en cantidades variables (Gomez et al., 2013; Salinas et al., 2011). Se ha descrito en el mucus la presencia de IgM e IgT secretadas (Salinas et al., 2011) aunque la detección de IgM es difícil ya que las proteasas del mucus intestinal son capaces de degradarla en un periodo corto de tiempo (Hatten et al., 2001). A pesar de que los niveles de IgM son mayores que los de IgT en el mucus, tras una infección parasitaria, sólo se han detectado incrementos en los niveles de IgT, lo que ha llevado a los autores a postular la función específica de mucosas de IgT (Zhang et al., 2010).

Respecto al GIALT, aunque desde hace décadas se sabe de la existencia de leucocitos distribuidos entre las lamelas branquiales, recientemente se ha descrito en los salmónidos una estructura inmunitaria nueva asociada a las branquias. Esta estructura, denominada tejido linfoide interbranchial (ILT, del inglés *interbranchial lymphoid tissue*), está compuesta principalmente por células T contenidas en una malla de células epiteliales (Haugarvoll et al., 2008; Koppang et al., 2010). Las diferencias morfológicas entre el timo y el ILT sugieren que ambos tejidos tienen diferentes funciones dentro del sistema inmunitario del salmón.

Además, la ausencia de transcripción del gen *rag* implicado en el desarrollo linfocitario en las branquias parece indicar que este tejido funciona como un órgano inmunitario secundario, aunque su papel específico en la defensa no se ha demostrado todavía (Koppang et al., 2010). Numerosas investigaciones parecen indicar que las branquias son una vía de entrada de patógenos, ya que a través de distintos métodos de seguimiento se ha podido observar como los patógenos se encuentran en el moco de la branquia y con el paso del tiempo se localizan en riñón u otros órganos internos (Kato et al., 2012; Ling et al., 2000; Nelson, 1985; Tatner y Manning, 1983). Algunos de estos patógenos que penetran a través de las branquias pueden no producir daños en ellas y simplemente utilizarlas como vía de paso.

Como consecuencia de la falta de queratinización de la piel en teleósteos, la capa externa de la piel está compuesta por células vivas (epiteliales, linfoides y mieloides) que se encuentran en contacto directo con el agua, algunas de las cuales tienen como función principal la secreción de moco que dificulta la penetración de los patógenos. Además, la piel de los peces gnatóstomos contiene glándulas unicelulares específicas tales como las células caliciformes, células sacciformes y células en forma de garrote (Zaccone et al., 2001). El mucus de la piel de los peces contiene moléculas inmunitarias innatas como son: lisozimas, complemento, lectinas, aglutininas, calmodulina, interferones, proteína C-reactiva, enzimas proteolíticas, péptidos antimicrobianos, vitelogenina, e inmunoglobulinas (Nigam et al., 2014). Estas moléculas se han descrito en diversas especies, tienen propiedades antimicrobianas y actúan contra virus y bacterias (Chaves-Pozo et al., 2012). En los teleósteos, la piel es la fuente principal de péptidos antimicrobianos, ya que un 70% de estos péptidos se expresan en la piel comparado con la branquia y el intestino que expresan un 52% y 29% respectivamente (Gomez et al., 2013). Además, la epidermis de diferentes especies contienen numerosas células B y T que responden a patógenos (Findly et al., 2013; Jorgensen et al., 2009; Xu et al., 2013).

Recientemente se ha descrito en la trucha arcoíris un tejido linfoide asociado a la mucosa nasofaríngea (NALT) constituido por células linfoides dispersas. A diferencia del NALT de vertebrados terrestres, en la trucha no se han observado estructuras amigdalinas o adenoides. Al igual que en la piel y el intestino se ha observado que las células B predominantes en este tejido son células  $IgT^+$ . Además, en ensayos de vacunación por vía nasal usando un virus atenuado se ha demostrado la existencia de una respuesta antiviral importante a nivel local en este tejido (Salinas et al., 2015; Tacchi et al., 2014).

#### 1.5.4. Células del sistema inmunitario innato

##### 1.5.4.1. Monocitos y macrófagos

Los macrófagos y sus precursores, los monocitos, son las principales células fagocíticas del sistema inmunitario. Los macrófagos tisulares están presentes en todo el cuerpo y contribuyen a la homeostasis de los tejidos y a la vigilancia inmunitaria. Por otro lado, los monocitos que se encuentran fundamentalmente en sangre, se extravasan rápidamente al tejido en respuesta a un daño o infección, diferenciándose en ese momento a macrófagos tisulares con una gran capacidad fagocítica, lo que les permite capturar antígenos de forma muy eficaz.

Los macrófagos también producen citoquinas que modulan la actividad de otros tipos celulares, siendo capaces de cambiar su fenotipo funcional dependiendo de los estímulos ambientales que reciben.

En base a estas señales, los macrófagos activados se dividen tradicionalmente en macrófagos activados por la vía clásica, inducidos en una respuesta de citoquinas tipo Th1 y macrófagos activados por la vía alternativa, inducidos en una respuesta de citoquinas tipo Th2. Clasificaciones más recientes han introducido nuevos subtipos de macrófagos. Una de estas clasificaciones es la que se realiza en base a los mecanismos de activación de los macrófagos en peces, que propone cuatro fenotipos diferentes (Forlenza et al., 2011).

Los macrófagos activados de forma innata son inducidos sólo por patógenos (o un estímulo microbiano de tipo PAMP). En este caso el patógeno es reconocido mediante receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll like receptors*) y es posteriormente fagocitado. En peces, la mayoría de la información que existe sobre la activación innata de macrófagos procede de la estimulación de estas células con moléculas antigénicas tipo lipopolisacárido bacteriano (LPS), aunque en algunos casos se ha utilizado también peptidoglicano, Poly I:C (ARN sintético de doble cadena), flagelina o ácido lipoteicoico (revisado en (Forlenza et al., 2011)). Los efectos que provocan estas moléculas sobre los macrófagos de peces varían según las especies, pero generalmente inducen la producción de radicales de oxígeno (estallido respiratorio) y nitrógeno, incrementan la fagocitosis y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Sorprende que los peces sean menos susceptibles a la estimulación y al shock séptico por LPS que los mamíferos, lo que sugiere que existen diferencias importantes en la manera en que las células detectan el LPS, en este grupo de animales que viven en ambientes acuáticos con una carga microbiana mayor que los terrestres.

Por ejemplo, el TLR4, encargado de detectar el LPS en las células de mamíferos, está ausente en salmónidos (Rebl et al., 2010), y no reconoce LPS en otras especies como el pez cebra (*Danio rerio*) en las que sí está presente (Sepulcre et al., 2009).

Los macrófagos activados por la vía clásica se activan por una combinación de un estímulo microbiano e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). El IFN- $\gamma$  se ha identificado en muchas especies de teleósteos y en algunas como pez cebra, pez gato (*Ictalurus punctatus*), carpa común y carpín dorado (*Carassius auratus*), se han descrito dos tipos de IFN- $\gamma$  que contienen todos los motivos conservados distintivos de IFN- $\gamma$ . En macrófagos de trucha, el IFN- $\gamma$  recombinante induce la transcripción de la proteína inducible por el IFN- $\gamma$  10 ( $\gamma$ IP-10), la cadena  $\alpha$  del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II, del inglés *major histocompatibility complex*), y

genes antivirales, así como una importante producción de especies reactivas de oxígeno (Zou et al., 2005). En el carpín dorado, el IFN- $\gamma$  recombinante aumenta la expresión de varios genes pro-inflamatorios y la respuesta fagocítica y producción de óxido nítrico (NO) de los macrófagos (Grayfer y Belosevic, 2009). Sin embargo, en la carpa, el IFN- $\gamma$  por sí mismo no produce ningún efecto, mientras que sólo en combinación con LPS induce un efecto en la producción de NO, estallido respiratorio y expresión de citoquinas pro-inflamatorias. En las especies que tienen un segundo IFN- $\gamma$ , se han detectado diferencias importantes en los efectos de las dos proteínas sobre los macrófagos, y aunque ambos genes producen moléculas activas funcionalmente, sus efectos sobre estas células son distintos (Forlenza et al., 2011).

Los macrófagos activados por la vía alternativa se diferencian en presencia de las citoquinas de respuesta Th2 tales como interleuquina 4 (IL-4) y/o IL-13 (Forlenza et al., 2011). En mamíferos estos macrófagos metabolizan la L-arginina de una forma diferente a los macrófagos activados por la vía innata o la vía clásica (Modolell et al., 1995). Los macrófagos de las vías innata y clásica convierten la L-arginina en L-citrulina y NO, mientras que los de la vía alternativa, la convierten en L-ornitina y urea mediante la activación de la arginasa, lo que impide la conversión de L-arginina en NO por medio de la enzima NO sintasa inducible, disminuyendo la producción de NO y actuando como un macrófago “antiinflamatorio” (Modolell et al., 1995). Aunque se han descrito genes homólogos a las IL-4 y IL-13 en algunas especies de peces (Li et al., 2007; Ohtani et al., 2008), no se han realizado estudios funcionales sobre estas moléculas, y todavía no existen evidencias de que esta vía de activación esté presente en teleósteos.

Finalmente, los macrófagos reguladores están asociados a la presencia de la citoquina reguladora IL-10, y por tanto se asocian a la atenuación de la inflamación. Pueden producirse en respuesta a una combinación de ligandos de TLR y una segunda señal como complejos inmunitarios, prostaglandinas, células apoptóticas, glucocorticoides, o ligandos unidos a receptores acoplados a proteína G (Mantovani et al., 2004). De nuevo, aunque la IL-10 está presente en los teleósteos (Inoue et al., 2005; Lutfalla et al., 2003; Pinto et al., 2007; Savan et al., 2003; Seppola et al., 2008; Zhang et al., 2005; Zou et al., 2003a), no existen todavía evidencias de que esta vía de activación de macrófagos funcione en peces de manera similar a la de mamíferos.

#### 1.5.4.2. Leucocitos polimorfonucleares (PMNs)

Los leucocitos polimorfonucleares son células de origen mieloide con una estructura característica que incluye, la forma polimórfica de su núcleo y la presencia de numerosos gránulos en el citoplasma. La nomenclatura usada en mamíferos para la clasificación de estas células se basa en la afinidad por colorantes ácidos o básicos de sus gránulos, lo cual no siempre se correlaciona con las características y las funciones de los granulocitos de peces. Además, muchas especies de peces sólo poseen un tipo de granulocito. Entre ellos, los neutrófilos son el tipo predominante que se encuentran en casi todas las especies, aunque algunos teleósteos poseen también gránulos acidófilos y/o basófilos además o en lugar de neutrófilos (Rowley, 1996).

➤ Neutrófilos: son uno de los principales tipos celulares atraídos a los sitios de infección en la fase más temprana, y poseen una actividad antimicrobiana fundamental, gracias a su gran capacidad fagocítica y a los efectos extracelulares que provoca la desgranulación de sus gránulos citoplasmáticos al exterior. Estos gránulos contienen un amplio repertorio de mediadores solubles, incluyendo enzimas, péptidos antimicrobianos y potentes moléculas redox. Además, son capaces de liberar unas estructuras descubiertas recientemente denominadas trampas extracelulares neutrofilicas (NETs, del inglés *neutrophil extracellular traps*), que son mallas formadas por ADN y proteínas que limitan el crecimiento de los patógenos (Henry et al., 2013; Pijanowski et al., 2013). Una vez activados, los neutrófilos también secretan moléculas señalizadoras para la activación y maduración de otras células inmunitarias. En peces, están presentes en la gran mayoría de las especies estudiadas, formando parte de la defensa innata y con funciones similares a las descritas en mamíferos como la fagocitosis y la desgranulación.

Los mecanismos antimicrobianos incluyen estallido respiratorio, y producción de NO que interfiere directamente con la supervivencia del patógeno, tanto a nivel intracelular (dentro del fagosoma) como extracelularmente. A nivel histoquímico, los neutrófilos muestran una fuerte actividad mieloperoxidasa tanto en teleósteos como en elasmobranquios (Lieschke et al., 2001).

➤ Eosinófilos y basófilos: los eosinófilos presentan afinidad por colorantes ácidos como la eosina. En mamíferos, estas células están implicadas fundamentalmente en la destrucción de parásitos internos y en la modulación de reacciones inflamatorias alérgicas. Se han descrito en varias especies de peces como los ciprínidos (Balla et al., 2010). En la dorada, las células con propiedades tintoriales de eosinófilo se han denominado granulocitos acidófilos, y

muestran una alta expresión del gen MHC II y gran capacidad fagocítica, lo que sugiere que tienen capacidad presentadora de antígenos (Cuesta et al., 2006). Los basófilos de vertebrados son leucocitos granulares poco comunes que contienen gránulos grandes con metacromasia basófila. En peces, sólo se han descrito en un número limitado de especies, y la mayoría de las caracterizaciones se han hecho en base a sus propiedades morfológicas y ultraestructurales (Ellis, 1977; Tavares-Dias y Moraes, 2006).

#### 1.5.4.3. Células dendríticas

Las células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*) en mamíferos representan el grupo de células presentadoras de antígeno más importante con las capacidades de presentación de antígeno más amplias. Sin embargo son muy escasos los trabajos relacionados con DCs en peces. En salmónidos, se han descrito células con morfología tipo DCs usando anticuerpos específicos para humanos (Haugland et al., 2012; Lovy et al., 2009; Lovy et al., 2006). En el pez cebra, se ha hallado una población de células con gran afinidad por la lectina aglutinina de cacahuete y características morfológicas típicas de DCs, que son capaces de fagocitar bacterias y activar linfocitos T de manera antígeno-dependiente (Lugo-Villarino et al., 2010). También se ha estudiado la adaptación de un protocolo de mamíferos para el enriquecimiento de cultivos en DCs, a partir de suspensiones de células de riñón o de bazo de trucha (Bassity y Clark, 2012). Estas células de cultivos enriquecidos son fagocíticas, tienen morfología tipo DC y se activan por ligandos de TLRs.

Sin embargo, debido a que los linfocitos B y los macrófagos también pueden fagocitar antígenos y presentarlos vía MHC de clase II, y dado que algunos de marcadores de DCs de mamíferos no parecen tan específicos en peces (Johansson et al., 2012), no está claro todavía la verdadera naturaleza de estas poblaciones celulares. Por último, recientemente se ha descrito por primera vez en peces un subtipo específico de DC, mediante la combinación de anticuerpos monoclonales frente a CD8 y MHC-II (Granja et al., 2015). Estas células con funciones típicas de DCs tales como una gran actividad fagocítica, reactividad a ligandos de TLRs o capacidad estimuladora de linfocitos T, se encuentran principalmente en mucosas, tales como la piel.

#### 1.5.4.4. Trombocitos

Similares a las plaquetas de los mamíferos, participan en la coagulación sanguínea. A diferencia de las plaquetas, los trombocitos tienen núcleo y se han descrito algunas funciones adicionales para ellos. Los trombocitos de carpa (Stosik et al., 2002), trucha (Hill y Rowley, 1998) y lubina (Meseguer et al., 1992) tienen capacidad fagocítica y se les ha supuesto un posible papel en la presentación de antígeno (Kollner et al., 2004).

#### 1.5.5. Células del sistema inmunitario adaptativo

El término “linfocito” hace referencia a tres tipos de leucocitos presentes en la linfa de mamíferos: los linfocitos B, los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*). Los linfocitos B y T son los encargados de llevar a cabo las respuestas específicas de la inmunidad adaptativa de vertebrados mandibulados. Ambos tipos de células comparten una característica única que es la reorganización somática del ADN que codifica los receptores específicos de antígeno (miembros de las inmunoglobulinas, Igs). Este proceso se produce por la recombinación al azar, de los múltiples segmentos génicos de las regiones variables presentes en el locus del receptor. Las células B expresan inmunoglobulinas que constituyen lo que se denomina receptor de células B (BCR, del inglés *B cell receptor*) cuando está anclado en la membrana celular, o anticuerpo cuando es secretado al medio. Los receptores de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*), sin embargo, siempre se encuentran asociados a la membrana.

En ambos casos, la región variable del receptor se ensambla a nivel genético cuando se produce la recombinación al azar de uno de los múltiples segmentos génicos denominados *variable* (V), con uno de los segmentos denominados *de diversidad* (D) y uno de los segmentos de *unión* (J, del inglés *functional Joining*) durante el proceso de maduración del linfocito. Este proceso de reorganización del ADN produce un amplio repertorio de células B y T, donde cada célula expresa un receptor único, aumentando así las posibilidades de reconocimiento específico de cualquier antígeno.

#### 1.5.5.1. Células B

Los linfocitos B suponen aproximadamente un 30% de los leucocitos circulantes (Blaxhall and Sheard, 1985; DeLuca et al., 1983) y los podemos encontrar en el hígado, bazo, sangre, riñón anterior y posterior, MALT y peritoneo (Abos et al., 2013; Salinas et al., 2011; Tafalla et al., 2017). En teleósteos se han descrito tres isotipos de Igs, que incluyen Igs homólogas a las IgM e IgD de mamíferos, y un tercer isotipo presente en varias especies de teleósteos designado IgZ en pez cebra e IgT en el resto de especies (Danilova et al., 2005; Hansen et al., 2005; Warr et al., 1979; Wilson et al., 1997). Por lo tanto, mientras los isotipos IgM e IgD parecen ser Igs esenciales, estando presentes en todos los teleósteos, el isotipo IgZ/T está presente sólo en algunas especies (Fillatreau et al., 2013).

En base a la expresión de las Igs en la membrana celular se han identificado cuatro subgrupos de células B en la trucha: células  $\text{IgM}^+/\text{IgD}^+/\text{IgT}^-$  (células  $\text{IgM}^+$ ), células  $\text{IgM}^-/\text{IgD}^-/\text{IgT}^+$  (células  $\text{IgT}^+$ ), y un tercer subgrupo de células  $\text{IgM}^-/\text{IgD}^+/\text{IgT}^-$  (células  $\text{IgD}^+$ ) descrito recientemente en las branquias de trucha arcoíris (Castro et al., 2014b; Hansen et al., 2005; Zhang et al., 2010). Este último grupo de linfocitos B también se ha visualizado en la sangre de pez gato, especie que no posee IgT, y que consta además de una subpoblación de linfocitos B  $\text{IgM}^+/\text{IgD}^-$  (Edholm et al., 2010), descrita por nosotros en trucha arcoíris como fenotipo de célula IgM diferenciada previamente a célula secretora de anticuerpo (ASCs, del inglés *antibody secreting cells*) (Tafalla et al., 2017).

En mamíferos, una vez que la célula B es activada por un antígeno, parte de su descendencia se convierte en ASCs mientras que otra parte se convierte en células de memoria a corto o largo plazo. Parece que esta diferenciación también tiene lugar en peces, aunque todavía se desconocen los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo. En trucha arcoíris por ejemplo, se han definido diferentes poblaciones de ASC a nivel celular y molecular, incluyendo plasmablastos (con capacidad de división, secreción de anticuerpos baja y mínima expresión de BCR) y células plasmáticas (sin capacidad de división, totalmente diferenciadas, secreción de anticuerpos alta y sin expresión de BCR). Estas últimas se subdividen a su vez en células plasmáticas de vida corta y células plasmáticas de vida larga (Bromage et al., 2004; Zwollo et al., 2008; Zwollo et al., 2010). Aunque la función principal de las células B es la producción de anticuerpos, tanto en peces como en mamíferos estas células tienen cierta capacidad presentadora de antígeno a células T.



En teleósteos, las células B tienen una gran capacidad fagocítica (Aquilino et al., 2016; Li et al., 2006), lo que las convierte en mejores presentadoras de antígenos particulados que las células B de mamíferos (Zhu et al., 2014). Igualmente, a través de esta función contribuyen a la eliminación de patógenos, y para ello cuentan también con capacidad microbicida (Salinas et al., 2011).

En las especies que expresan IgT, la subpoblación de células  $\text{IgM}^-/\text{IgD}^-/\text{IgT}^+$  está fundamentalmente presente en los tejidos mucosos, y según algunos modelos de infección se ha observado que las células  $\text{IgT}^+$  tienen una función principal en la defensa de mucosas. Por ejemplo, mientras que las células  $\text{IgT}^+$  representan el 16-28% de las células B de trucha en la sangre, bazo, riñón anterior y cavidad peritoneal, son la población mayoritaria de células B en el intestino (54,3%) (Zhang et al., 2010). Además, se ha descrito que tras una infección con un parásito intestinal, la respuesta predominante en intestino es la de IgT, mientras que la respuesta de IgM se observa en el suero (Zhang et al., 2010). Sin embargo, también se ha observado una respuesta de células  $\text{IgM}^+$  frente a patógenos o antígenos en mucosas así como, una participación de IgT a nivel sistémico en infecciones virales (Castro et al., 2013a) o en vacunación con ADN (Castro et al., 2013b), por lo que la contribución de IgT en la eliminación de patógenos tanto a nivel sistémico como de mucosas continua siendo objeto de investigación. De forma similar, la transcripción de IgM se modula en varios segmentos del tubo digestivo en respuesta a antígenos (Ballesteros et al., 2013a; Ballesteros et al., 2013b). En el caso de la piel, el isotipo predominante en las respuestas a patógenos también parece ser IgT (Xu et al., 2013). No obstante, en trucha se ha visto que en las branquias ambos isotipos se unen a estructuras superficiales del parásito *Ichthyophthirius multifiliis* al comienzo de la infestación (Xu et al., 2013).

#### 1.5.5.2. Células T

Las células T se caracterizan por la presencia del TCR en su membrana. A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T no son capaces de reconocer el antígeno directamente y dependen de la presentación antigénica, es decir, reconocen antígenos sólo cuando están expuestos en el complejo proteico de la superficie celular denominado MHC de clase I o II. La única excepción a esto es en el caso de los superantígenos, antígenos reconocidos de forma directa que producen una activación policlonal no específica de células T junto con una secreción masiva de citoquinas.

Una primera clasificación de linfocitos T se basa en las cadenas del TCR que expresan, pudiendo ser heterodímeros de cadenas  $\alpha\beta$  o de cadenas  $\gamma\delta$ . Las células T $\gamma\delta$  reconocen antígenos no procesados, de forma similar a los receptores invariables de reconocimiento de patrones antigénicos. En mamíferos, las células T $\gamma\delta$  se consideran células con una función innata, con poca dependencia de la presentación por MHC.

Estas células se encuentran principalmente en los tejidos epiteliales y mucosos, representando el 2% de la población total de células T (Bonneville et al., 2010).

Las células convencionales T $\alpha\beta$  se subdividen a su vez en células T citotóxicas (Tc) y células T cooperadoras (Th, del inglés *T helper*), caracterizadas por la expresión diferencial de las glicoproteínas de membrana CD8 o CD4 respectivamente. Estas glicoproteínas actúan como co-receptores para el TCR, estabilizando su interacción con el MHC y facilitando su activación a través de la ruta de fosforilación del CD3. Las células Tc, que expresan CD8 en la superficie, son capaces de eliminar células infectadas o cancerosas, reconociendo los antígenos ajenos o antígenos derivados de células cancerosas presentados en el contexto de MHC de clase I (Strasser et al., 2009). Las células Th expresan CD4 en su superficie y producen citoquinas para regular las funciones de otras células inmunitarias, fundamentalmente de los linfocitos B.

En mamíferos, las células Th se sub-clasifican en diferentes grupos atendiendo a la expresión de factores de transcripción definidos, y a la secreción de combinaciones específicas de citoquinas. Los subgrupos más definidos en mamíferos incluyen Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Treg), aunque en la actualidad existe controversia sobre si estos subgrupos representan líneas celulares distintas, o son células en diferentes estados de activación (Kleinewietfeld y Hafler, 2013). En cualquier caso, las células Th1 secretan citoquinas efectoras como IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés *tumor necrosis factor*) para controlar infecciones intracelulares, e interleuquinas (IL), como IL-2 para inducir la proliferación de linfocitos. Las células Th2 producen IL-4, IL-5 y IL-13, que estimulan a las células B, y por lo tanto están más implicadas en el control de infecciones extracelulares mediante la secreción de anticuerpos. Las células Th17 producen IL-17, IL-21 e IL-22, y parecen estar dedicadas al control de infecciones extracelulares de bacterias y hongos. Además juegan un papel importante en algunas enfermedades autoinmunitarias humanas. Recientemente se ha descubierto en mamíferos un grupo de células Th22 que secretan IL-22 pero no IL-17 y participan en la reparación de la epidermis. Por último, las células Treg juegan un papel importante en los procesos de tolerancia, principalmente, mediante la secreción de IL-10 (Akdis et al., 2011).

Se han identificado en varias especies de teleósteos y elamobranquios las cuatro cadenas del TCR (Criscitiello et al., 2006; Flajnik y Kasahara, 2010; Nam et al., 2003). Las células Tc maduras expresan un heterodímero de CD8 formado por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (revisado en (Laing y Hansen, 2011)) y estas cadenas se han secuenciado en muchas especies de teleósteos (Buonocore et al., 2006; Hansen y Strassburger, 2000; Moore et al., 2005; Patel et al., 2008; Pinto et al., 2006; Somamoto et al., 2006; Suetake et al., 2007; Sun et al., 2007). Además, gracias a la producción de anticuerpos específicos anti-CD8 $\alpha$ , se ha comprobado que las células Tc CD8<sup>+</sup> también en peces tienen como función principal la eliminación de células infectadas por virus, cuando el TCR es compatible con el MHC en el que está expuesto el péptido antigénico (Fischer et al., 2006).

Asimismo, se han identificado genes ortólogos de CD4 en muchas especies de peces (Buonocore et al., 2008; Edholm et al., 2007; Laing et al., 2006; Moore et al., 2009; Patel et al., 2009; Sun et al., 2007; Wen et al., 2011), sin embargo hay pocos datos acerca de la funcionalidad de las células Th CD4<sup>+</sup> ya que sólo se dispone de anticuerpos específicos contra estas moléculas en especies muy concretas. En el caso del pez cebra, la obtención de un anticuerpo policlonal frente a CD4 ha permitido determinar que estas células secretan distintas citoquinas en respuesta a antígenos, siguiendo patrones parecidos a los esperados en mamíferos (Yoon et al., 2015).

En el caso de algunas especies, además de CD4 se ha encontrado un gen CD4 adicional (designado como CD4L o CD4REL), que podría tener un origen más antiguo y una función diferente aún por determinar (Dijkstra et al., 2006; Laing et al., 2006). Por último, en los teleósteos se han reconocido la mayoría de los genes de citoquinas y factores de transcripción representativos de las distintas subpoblaciones de células Th descritas en mamíferos, lo que sugiere que también en estas especies existen diferentes subtipos, aunque todavía no está claro si estos son equivalentes a los de mamíferos y si las funcionalidades se mantienen (revisado en (Laing y Hansen, 2011)).

Las células T están presentes en el timo, bazo, riñón anterior y los tejidos mucosos como branquias, piel e intestino (revisado en (Laing y Hansen, 2011)), y se han detectado usando tanto anticuerpos específicos anti-CD8 como algunos anticuerpos anti-células T desarrollados frente a dianas aún por determinar. Estos últimos se desarrollaron mediante inmunizaciones masivas y reaccionan frente a linfocitos que no expresan IgM (Rombout et al., 1998; Scapigliati et al., 2000).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que actualmente se conocen poblaciones de células B de peces que no expresan IgM, habría que tomar los resultados derivados de estos trabajos con cautela, y sería conveniente una caracterización completa de estos anticuerpos, identificando de forma específica el epítipo que reconocen (Abelli et al., 1999; Romano et al., 2011; Scapigliati et al., 2000).

Por otra parte, diseños experimentales enfocados en moléculas específicas como el CD3, que está presente en todas las células T, han obtenido también buenos resultados. Con un anticuerpo policlonal contra la región intracelular del CD3 épsilon de salmónidos se han observado poblaciones numerosas de células CD3<sup>+</sup> en el timo, branquia e intestino, y un número menor de células en el riñón anterior, bazo y sangre periférica (Koppang et al., 2010). Curiosamente, con otro anticuerpo monoclonal anti-CD3 de trucha se han obtenido proporciones altas de células positivas en el timo, piel y riñón posterior pero bajas en riñón anterior, bazo, branquias y sangre periférica (Boardman et al., 2012).

#### 1.5.5.3. Células NK

La citotoxicidad mediada por células es un proceso por el que el sistema inmunitario detecta y elimina células ajenas al organismo, o células propias alteradas, tumorales o infectadas por virus, con el fin de mantener la homeostasis. En colaboración con las células Tc que lo harían de forma específica como parte del sistema inmunitario adaptativo, las células NK representan la primera línea de defensa, encargadas de realizar este proceso como parte del sistema innato. Las células NK son células efectoras de origen linfoide, que se caracterizan por la presencia de marcadores de superficie únicos (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y la ausencia de genes TCR o Ig recombinados (Vivier et al., 2008). Estas células poseen gránulos citotóxicos y su actividad de eliminación es similar a la de los linfocitos Tc, excepto en que utilizan receptores innatos no específicos para el reconocimiento de antígenos (Lieberman, 2003).

#### 1.5.6. Citoquinas

El sistema inmunitario incluye un importante repertorio de reguladores que organizan y regulan todos los procesos inmunitarios, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis. Dentro de estas moléculas, las citoquinas constituyen el grupo más importante.

Son pequeñas proteínas ( $\approx 5\text{-}20$  KDa) secretadas por células (principalmente leucocitos), que regulan las funciones inmunitarias a través de la interacción con receptores específicos de la superficie de otras células (paracrina), o de la misma célula que las produce (autocrina). En algunos casos específicos, la secreción de citoquinas puede producir efectos a nivel sistémico (regulación endocrina). Cada citoquina puede ser producida por diferentes tipos celulares y de la misma manera, su receptor puede estar expresado en la superficie de diferentes tipos de leucocitos, por lo que sus funciones suelen ser múltiples. También es destacable que varias citoquinas pueden tener una función similar por lo que hay un grado importante de duplicación.

#### 1.5.6.1. Interleuquinas

El término IL se utilizó por primera vez en 1976 (Cohen, 1976), para designar moléculas que señalizan entre diferentes tipos de leucocitos, y aunque hoy en día se sabe que estas ILs no sólo regulan funciones, ni son sintetizadas exclusivamente por ellos, esta nomenclatura se ha mantenido (revisado en (Secombes et al., 2011)). En mamíferos, se han identificado 35 ILs hasta el momento, algunas de las cuales están agrupadas en subfamilias de moléculas con parecida estructura o similares receptores (Akdis et al., 2011). En 2011, se publicó una excelente revisión de las ILs descritas hasta el momento en peces, clasificándolas de forma similar en diferentes familias (Zou y Secombes, 2016):

- La familia de la IL-1 está compuesta en mamíferos por 11 moléculas pro-inflamatorias o agonistas de otras moléculas pro-inflamatorias. En trucha y en numerosas especies ha sido descrita la IL-1 $\beta$  (revisado en (Secombes et al., 2011)), así como la IL-18, otro miembro de esta familia, en pez globo y trucha (Huisin et al., 2004; Zou et al., 2004).
- La familia de la IL-6 incluye la IL-6, la IL-11, la IL-31 y otras citoquinas de mamíferos como CNTF, LIF, OSM, CT-1 y CT-2 (revisado en (Secombes et al., 2011)). Se han descrito homólogos de la IL-6 y la IL-11 en varias especies de peces, que pueden ser modulados en respuesta a diferentes estimulaciones (revisado en (Secombes et al., 2011)).
- La familia de la IL-2 en mamíferos está compuesta por la IL-2, la IL-4, la IL-7, la IL-9, la IL-15 y la IL-21. Todas están implicadas en la memoria de células T o corresponden a moléculas liberadas por la estimulación de respuestas Th. Todas ellas menos la IL-9 han sido encontradas en peces (revisado en (Secombes et al., 2011)).

- La familia de IL-10 comprende la IL-10, una citoquina antiinflamatoria, así como la IL-19, la IL-20, la IL-22, la IL-24 y la IL-26 (Lutfalla et al., 2003). Se ha demostrado en diversas especies de peces que se induce la transcripción de la IL-10 en respuesta a LPS o una infección bacteriana (Inoue et al., 2005; Lutfalla et al., 2003; Pinto et al., 2007; Savan et al., 2003; Seppola et al., 2008; Zhang et al., 2005; Zou et al., 2003a); sin embargo sus efectos antiinflamatorios o reguladores se desconocen.
- La subfamilia de la IL-17 está compuesta por 6 miembros en mamíferos, denominados de IL-17A a IL-17F. Es la única subfamilia que se ha descrito en invertebrados (revisado en (Secombes et al., 2011)). En peces, se han encontrado varios miembros de la familia, aunque ha sido difícil de establecer la homología con sus correspondientes moléculas en mamíferos.

#### 1.5.6.2. Quimioquinas

Las quimioquinas son una familia de citoquinas que regulan la migración de las células inmunitarias, su maduración y la funcionalidad de las células atraídas en respuesta a la inflamación. Son producidas por varios tipos celulares y actúan sobre los linfocitos mediante la interacción con receptores específicos, de tipo receptor de proteína G que se encuentran en la superficie celular. Se definen por la presencia de cuatro residuos de cisteína conservados y se dividen en cuatro clases atendiendo a la organización de las dos primeras cisteínas conservadas en su secuencia en las clases CXC, CC, C y CX<sub>3</sub>C (Zlotnik y Yoshie, 2000).

En teleósteos, las quimioquinas del tipo CXC actúan sobre neutrófilos, monocitos y linfocitos (Cai et al., 2009). Los análisis filogenéticos de las secuencias de quimioquinas CXC de teleósteos han identificado seis grupos diferentes: CXCa, CXCb, CXCc, CXCd, CXCL12 y CXCL14 (revisado en (Huising et al., 2003)). Sin embargo no se han reseñado quimioquinas de cada grupo en todas las especies. En un estudio reciente publicado por Bird y Tafalla (Bird y Tafalla, 2015) se puede encontrar una amplia revisión de las quimioquinas CXC identificadas en los peces, que incluye la nueva propuesta de nomenclatura unificada para quimioquinas CXC de peces, anfibios y reptiles basada en un extensivo estudio filogenético (Chen et al., 2013).

La familia de quimioquinas CC, ha experimentado un gran incremento en algunas especies de peces, evidenciando un proceso extensivo de duplicaciones intracromosómicas específico de especies. Hasta el momento se han identificado 18 genes diferentes en trucha arcoíris (Dixon et al., 1998; Laing y Secombes, 2004b; Liu et al., 2002), 30 en salmón atlántico

(Peatman y Liu, 2007), 26 en pez gato (Bao et al., 2006; Peatman y Liu, 2007), y 81 genes en pez cebra (Nomiya et al., 2008). Esto ha complicado en gran manera la identificación de verdaderos ortólogos entre moléculas de peces y mamíferos. Tanto en peces como en mamíferos, las quimioquinas CC se dividieron en un primer momento en “inflamatorias o inducibles”, las cuales se expresan sólo tras una estimulación inmunitaria, y “homeostáticas o constitutivas”, que se producen en condiciones fisiológicas normales (Laing y Secombes, 2004a; Zlotnik, 2006). Sin embargo, a medida que se dispuso de más información sobre estos mediadores, se vio que muchas quimioquinas tienen un papel doble. Finalmente, en peces a través de un análisis filogenético muy extenso se han establecido siete grandes grupos de quimioquinas CC: CCL19/21/25, CCL20, CCL27/28, CCL17/22, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP, del inglés *macrophage inflammatory protein*), proteína quimiotáctica para monocitos (MCP, del inglés *monocyte chemotactic protein*), y un grupo específico de peces (Peatman y Liu, 2007).

Se ha sugerido que este grupo de quimioquinas CC de peces puede representar un subgrupo de quimioquinas ancestrales comunes a todos los teleósteos, con características funcionales importantes todavía sin identificar.

Con respecto a las otras dos familias de quimioquinas que existen en mamíferos, C y CX<sub>3</sub>C, hasta el momento sólo se han establecido quimioquinas C en el pez cebra (Nomiya et al., 2008). Además, se ha identificado una nueva familia de quimioquinas en el pez cebra que se ha denominado CX y que incluye 5 miembros (Nomiya et al., 2008). No se conoce todavía la funcionalidad de estas quimioquinas.

A pesar del gran número de genes de quimioquinas identificados en muchas especies de peces, sólo en unos pocos estudios se ha demostrado la capacidad quimiotáctica de estas moléculas (Alejo y Tafalla, 2011; Aquilino et al., 2016; Bird y Tafalla, 2015). Aunque el número de genes de receptores para quimioquinas descrito en peces también ha ido creciendo recientemente, hasta el momento solamente se conocen unas pocas correspondencias receptor/quimioquina (Knaut et al., 2003; Perlín y Talbot, 2007) lo que hace más difícil entender la funcionalidad de estas moléculas.

#### 1.5.6.3. Interferones

Los IFN son citoquinas especializadas en actividad antiviral, ya que se secretan principalmente en respuesta a estímulos de origen vírico. En mamíferos, se clasifican en tres subfamilias (I, II y III), dependiendo de su estructura genética, el tipo celular que los produce

y los receptores a través de los cuales señalizan (Secombes y Zou, 2017). Mientras que existen diferentes IFNs de tipo I y III, sólo hay un gen de IFN tipo II en mamíferos. En peces se han descrito IFNs tipo I y II, y en varias especies existen al menos dos genes de IFN tipo II (Secombes y Zou, 2017).

Los IFNs tipo I son producidos por cualquier célula en respuesta a una infección viral y constituyen el principal mecanismo antiviral de vertebrados. Aunque se han descrito respuestas que sugerían la existencia de IFNs de tipo I en peces desde hace años, no fue hasta 2003 cuando se clonaron y describieron estas moléculas en tres trabajos independientes en distintas especies: trucha (Altmann et al., 2003), salmón atlántico (Robertsen et al., 2003) y pez globo (Lutfalla et al., 2003). Tras estos estudios, se han identificado genes tipo I en múltiples especies (revisado en (Zou y Secombes, 2011)).

En peces, los IFNs de tipo I pueden dividirse a su vez en dos grupos atendiendo al número de cisteínas presentes en su secuencia, el grupo I (2C) y grupo II (4C), aunque hasta el momento los IFN del grupo II sólo se han encontrado en salmónidos y ciprínidos, y su expresión parece estar restringida a tipos celulares específicos como los leucocitos (Zou y Secombes, 2011; Zou et al., 2007).

Los estudios de bioactividad llevados a cabo hasta el momento se han orientado principalmente a los IFNs del grupo I, demostrándose en la mayoría de los casos, una gran actividad antiviral y capacidad para inducir una señalización molecular similar a la que se desencadena en mamíferos (revisado en (Zou y Secombes, 2011)). Los escasos trabajos que se han centrado en la actividad de los IFNs del grupo II sugieren efectos antivirales complementarios (Aggad et al., 2009; Levraud et al., 2007; Lopez-Munoz et al., 2009; Zou et al., 2007).

En general, los efectos antivirales directos de los IFNs tipo I en las células infectadas y células próximas, están mediados por la inducción de un gran grupo de genes denominados genes inducidos por IFN como por ejemplo Mx, o proteína kinasa R (PKR). En mamíferos, estas proteínas tienen efectos antivirales directos, muchos de los cuales todavía no se han comprobado en peces (Staeheli, 1990). La proteína Mx es la proteína inducida por IFN más ampliamente estudiada en teleósteos para la cual se han descrito hasta tres isoformas en peces (Chen et al., 2006; Tafalla et al., 2004; Trobridge et al., 1997; Zhang et al., 2004).

Sin embargo, su actividad antiviral sólo se ha demostrado en el caso de algunas especies (Caipang et al., 2003; Fernandez-Trujillo et al., 2011; Fernandez-Trujillo et al., 2013; Larsen et al., 2004).



En mamíferos, el IFN tipo II (IFN- $\gamma$ ) está producido por distintas células del sistema inmunitario (células Th1 y NK fundamentalmente), para favorecer respuestas de tipo Th1, dirigidas básicamente contra patógenos intracelulares tales como virus o bacterias intracelulares, a través de la activación de linfocitos Tc y macrófagos (Boehm et al., 1997). En muchas especies de teleósteos se han identificado ortólogos de IFN- $\gamma$  y en algunas especies se ha encontrado también un IFN- $\gamma$  adicional que se ha denominado IFN- $\gamma$ rel (Boehm et al., 1997; Zou y Secombes, 2011). Está ampliamente aceptado que este gen es un segundo miembro de la familia de IFNs tipo II, que apareció en los teleósteos tras la duplicación del gen del IFN- $\gamma$  (Zou y Secombes, 2011). La bioactividad de IFN- $\gamma$  en peces se ha estudiado en algunas especies, verificando su actividad principalmente sobre macrófagos, demostrando que es capaz de activar en estas células la expresión de MHC I y MHC II (Martin et al., 2007; Zou et al., 2005), la producción de NO, el estallido respiratorio y la capacidad fagocítica (Grayfer y Belosevic, 2009; Zou et al., 2005). Además, se ha comprobado que algunos de los genes antivirales inducidos por el IFN tipo I tales como Mx pueden ser también inducidos por el IFN tipo II (Jorgensen et al., 2007), aunque la capacidad antiviral de este IFN es mucho menor que la de los IFNs de tipo I (Xu et al., 2010).

#### 1.5.6.4. Otras citoquinas

Otras familias de citoquinas importantes incluyen los TNFs, factor de crecimiento transformante (TGFs, del inglés *transforming growth factor*) y factores estimuladores de colonias (CSFs, del inglés *colony stimulating factors*).

En mamíferos, la superfamilia TNF agrupa a 19 miembros con un amplio rango de funciones que incluyen competencias fundamentales en inflamación, defensa, autoinmunidad, organogénesis, apoptosis celular y diferenciación (Ware, 2003). El TNF- $\alpha$ , el miembro de la familia más estudiado, ha sido identificado en varias especies de peces, existiendo dos variantes de esta proteína por especie en muchos casos (Kinoshita et al., 2013; Zou et al., 2003b). En pez cebra, se ha observado que el TNF- $\alpha$  interviene en mecanismos de apoptosis celular inducida por virus, lo que sugiere que la función de esta molécula está conservada respecto a lo que ocurre en mamíferos (Wang et al., 2011). Sin embargo, también se ha visto en dos modelos de peces diferentes que el TNF- $\alpha$  media una respuesta pro-inflamatoria (Roca et al., 2008). Recientemente se ha descrito que la administración de TNF- $\alpha$  junto con una vacuna oral frente a *Vibrio* induce una respuesta protectora mayor y un mayor nivel de transcripción de IgT en lubina (Galindo-Villegas et al., 2013).

El TGF- $\beta$  es una citoquina multifuncional, implicada en el crecimiento celular, migración, diferenciación y apoptosis, perteneciente a la familia de TGF (Kee et al., 2001; Kelly et al., 2017a). Es también un importante regulador de la proliferación de linfocitos T y B, y tiene efectos en macrófagos, DCs y células NK (Strobl y Knapp, 1999; Li y Flavell, 2006). Aunque dependen de la dosis, en general estos efectos sobre las células inmunitarias son antiinflamatorios, recuperando la homeostasis celular. En mamíferos, se han identificado tres isoformas de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3. Éstas son similares tanto en estructura como en función biológica, siendo el TGF- $\beta$ 1 la forma predominante del sistema inmunitario. En peces, se ha identificado TGF- $\beta$ 1 en especies como pez cebra (Kohli et al., 2003), trucha arcoíris (Hardie et al., 1998), dorada (Tafalla et al., 2003), carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Yang y Zhou, 2008) y lubina rayada (*Morone saxatilis*) (Harms et al., 2000). Sin embargo, la información sobre las funciones biológicas de estas moléculas muy escasa. En carpa, el TGF- $\beta$ 1 inhibe la proliferación inducida *in vitro* por LPS y fitohemaglutinina (PHA, del inglés *phytohaemagglutinin*) en leucocitos de sangre periférica, aunque también es capaz de aumentar la expresión de MHC clase I y la proliferación de estos leucocitos en ausencia de estímulo (Yang y Zhou, 2008).

Los CSFs son citoquinas con una función central en la hematopoyesis, activando rutas de señalización intracelulares que inducen la proliferación y diferenciación de las células inmaduras, en un tipo específico de células sanguíneas. Además, pueden influenciar la modulación de funciones inmunitarias en células maduras específicas para mantener la homeostasis y la competencia inmunitaria (Barreda et al., 2004). Dentro de este grupo, se incluyen el CSF de macrófagos (M-CSF) y el CSF de granulocitos (G-CSF), dos moléculas con relativa especificidad de linaje, que actúan en la proliferación, diferenciación y supervivencia de macrófagos, neutrófilos y sus precursores. Por otra parte, el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el CSF múltiple (IL-3) actúan en estadios más tempranos del desarrollo de las células, regulando la expansión y maduración de los progenitores hematopoyéticos iniciales.

### 1.5.7. Otros factores solubles

➤ Péptidos antimicrobianos: son péptidos pequeños, menores de 100 aminoácidos con actividad microbicida directa. La mayoría son moléculas catiónicas y anfipáticas, aunque también pueden encontrarse en algún caso péptidos aniónicos. Se sintetizan en forma de pro-péptidos y una vez que los péptidos activos se liberan por escisión, interaccionan directamente con los patógenos, produciendo la rápida destrucción del microorganismo (tanto bacterias como virus, protozoos y hongos) o de células tumorales (Chia et al., 2010; Cuesta et al., 2008; Mihajlovic y Lazaridis, 2010). Pese a que su función principal es la lisis directa de los patógenos, tienen otras funciones relevantes como la neutralización de endotoxinas o la actividad quimiotáctica e inmunomoduladora sobre distintas células del sistema inmunitario. En peces, se han encontrado un gran número de péptidos antimicrobianos que incluyen péptidos catiónicos, péptidos de  $\alpha$ -hélice lineales anfipáticos (piscidinas, moronecidinas, gaduscidinas, epinecidina, pleurocidina, crisofsinas, catelicidinas), péptidos catiónicos derivados de proteínas grandes (derivados de histonas, de hemoglobina, de hemocianina) o péptidos catiónicos con cisteínas que forman uniones intramoleculares (defensinas, hepcidinas) (revisado en (Rajanbabu y Chen, 2011; Valero et al., 2013)). También se han descrito péptidos aniónicos en *Setipinna taty* (Song et al., 2012). Los péptidos antimicrobianos se expresan fundamentalmente en la piel y epitelios mucosos, pero se ha reportado también su expresión constitutiva e inducible en muchos tejidos como el hígado, riñón, sangre, bazo, branquias, ojos, gónadas y glándula pituitaria (Nam et al., 2010; Rajanbabu y Chen, 2011; Valero et al., 2013). Se ha demostrado la actividad de muchos de estos péptidos antimicrobianos de peces contra un amplio número de patógenos bacterianos, virales o fúngicos (Casadei et al., 2009; Chang et al., 2005; Cuesta et al., 2008; Zhao et al., 2009).

➤ Complemento: las proteínas y glicoproteínas que constituyen el complemento son sintetizadas principalmente por los hepatocitos, aunque otras células como los monocitos, macrófagos y las células epiteliales de los tractos genitourinarios y gastrointestinales también las producen. Las numerosas funciones del complemento incluyen la eliminación de patógenos invasores, la promoción de respuestas inflamatorias, la limpieza de restos celulares y la modulación de las respuestas inmunitarias adaptativas (Walport, 2001a, b).







# Objetivos





Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Caracterizar el sistema inmunitario en piel de la trucha arcoíris y su regulación frente a infecciones virales, evaluando la distribución de las células inmunitarias en la piel, y su regulación frente a infecciones virales.
2. Estudiar el efecto de dietas suplementadas en la inmunidad de mucosas así como de tejidos inmunes sistémicos, determinando los niveles de transcripción de varios genes inmunitarios, la producción de anticuerpos naturales y los efectos sobre la replicación viral; teniendo en cuenta los tiempos óptimos de administración de estas dietas.
3. Analizar los efectos de la vitamina C sobre funciones innatas de células RTS11 y leucocitos de riñón de trucha, incluyendo estudios funcionales tales como estallido respiratorio, capacidad fagocítica o migración celular; así como, estudios transcripcionales para determinar los efectos sobre la respuesta antimicrobiana y pro-inflamatoria.



## **Materiales y métodos**



### 3.1. Animales

Los peces utilizados durante el desarrollo de esta Tesis fueron truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes del Centro de Acuicultura El Molino (Manzanares El Real, Madrid). Los animales permanecieron en el animalario del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) con un sistema adecuado de recirculación de agua, manteniendo la temperatura del agua a 16°C y con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12 horas. Antes del inicio de cualquier experimento, se sometió a las truchas a un período de aclimatación de 15 días, durante el cual se descartaba la presencia de alteraciones o posibles signos clínicos.

También fueron utilizados ejemplares de rodaballo (*Psetta maxima*). En este caso, los peces fueron aclimatados en La Estación de Ciencias Marinas de Toralla (ECIMAT) con un sistema adecuado de recirculación de agua, manteniendo la temperatura del agua a 18°C y con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12 horas. Dichos animales eran aproximadamente de 4 cm de largo y procedían de las costas de Galicia.

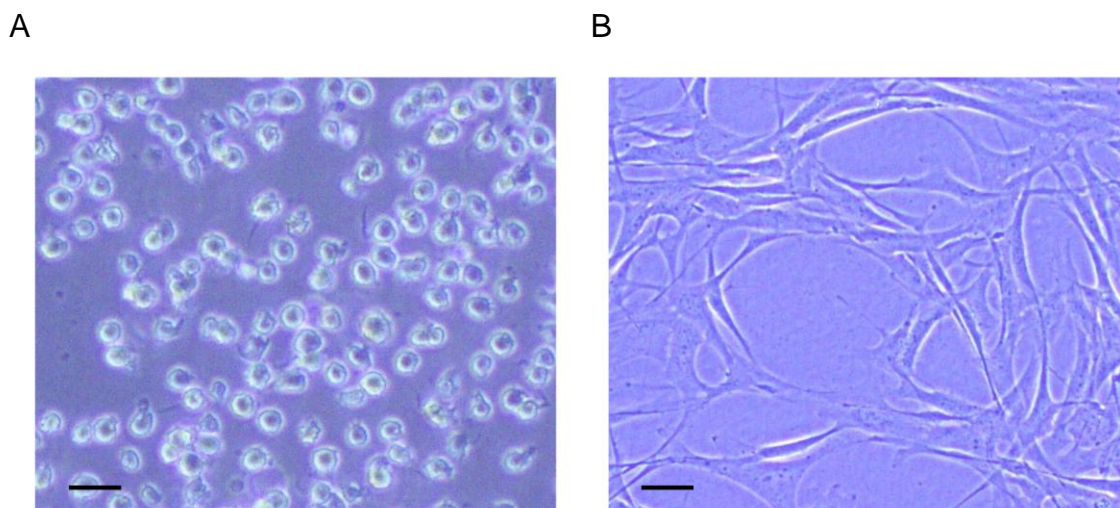
El manejo de los animales cumple con la normativa recogida en “Guidelines of the European Union Council” (2010/63/EU) para el uso de animales de laboratorio y todos los experimentos realizados fueron previamente autorizados por el Comité de Ética del INIA (Código CEEA 2014-015).

### 3.2. Líneas celulares

Durante esta Tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares:

➤ RTS-11: es una línea celular obtenida a partir de cultivos hematopoyéticos de bazo de trucha arcoíris (Ganassin y Bols, 1998). Esta línea de monocitos-macrófagos se mantuvo a 19°C en medio Leibovitz (L-15, Gibco, Invitrogen) suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y 20% de suero bovino fetal (FCS, Gibco, Invitrogen), previamente descomplementado mediante su incubación a 56°C durante 30 minutos.

➤ RTG-2: es una línea celular establecida de fibroblastos obtenidos a partir de gónadas de trucha arcoíris en 1962 (Wolf y Quimby, 1962). Esta línea, de origen fibroblástico, se mantuvo a 19°C en medio L-15 suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y 10% de FCS previamente descomplementado.



**Figura 3. Fotografía microscópica de las líneas celulares utilizadas en esta Tesis.** (A) Fotografía microscópica de la línea RTS11, en la que se puede observar una población de células adherentes minoritaria y una población de células no-adherentes mayoritaria. (B) Fotografía microscópica de la línea RTG-2. La barra representa una escala de 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Virus de la septicemia hemorrágica (VHSV)

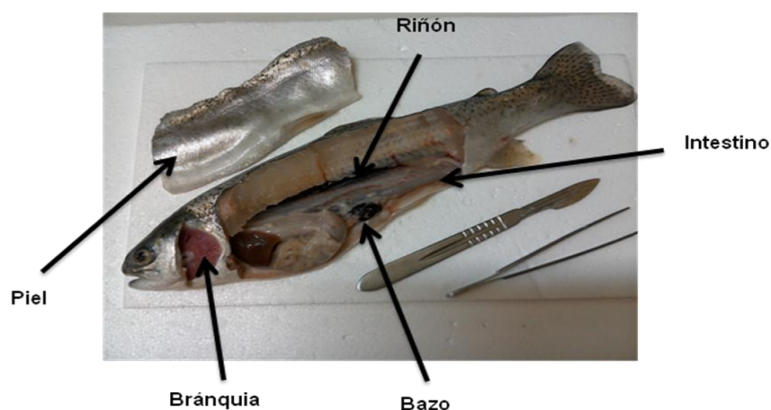
En esta Tesis Doctoral se utilizaron las cepas 0771 y 3592B del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). Para la obtención de existencias virales, se utilizaron cultivos de RTG-2 en monocapa con una confluencia del 80%, a las que se les retiró el medio de cultivo para posteriormente inocular virus a una concentración equivalente a una multiplicidad de infección de 0.1. Después de un período de adsorción de 30 minutos a 5-10°C, se cubrió el tapiz celular con medio de mantenimiento (medio L-15 suplementado con antibióticos y FCS al 2%). Las células se incubaron con el virus a 14°C hasta observar un efecto citopático completo, tras lo cual se recogieron los sobrenadantes y se les aplicó un ciclo de congelación y descongelación para romper las células y liberar el virus. Los sobrenadantes se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C para eliminar los posibles restos celulares. Todos los virus fueron titulados y almacenados a -80°C. Las titulaciones virales se llevaron a cabo de acuerdo con el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938). Se prepararon diluciones seriadas del virus (rango de dilución 1:10) en medio L-15 con antibióticos y 2% de FCS. Se inocularon tres réplicas de cada dilución en una placa de microtitulación de 96 pocillos con monocapas confluentes de células RTG-2, y se incubaron a 14°C.

Tras 5-7 días de infección, la lectura del título se expresó como la dosis infectiva citotóxica al 50%, es decir, la dilución del virus para la que se observa lisis celular en la mitad de los pocillos inoculados (TCID<sub>50</sub>/ml, del inglés *tissue culture infective dose*).

### 3.4. Obtención de tejidos de trucha

Para la obtención de muestras de tejido de truchas, animales de unos 7-9 cm se sacrificaron previamente con una sobredosis de benzocaína (Sigma) (30 mg/l). En el caso de los experimentos para determinar la transcripción de genes inmunitarios en las distintas zonas de la piel, 7 secciones de piel de 1 cm<sup>2</sup> se obtuvieron con la ayuda de un bisturí. Las secciones de piel, todas extraídas de la misma cara del pez, se limpiaron en PBS estéril para retirar todo el músculo adherido. Las muestras limpias se introdujeron en Trizol (Invitrogen) para llevar a cabo la extracción de ARN. En algunos de estos experimentos, también se tomaron muestras de bazo, que se extrajo y se introdujo directamente en Trizol (Fig. 5).

La obtención de suero se efectuó a través de la extracción de sangre periférica de los animales mediante punción en la vena caudal con una jeringuilla de 1 ml. Tras 1 hora a temperatura ambiente, la sangre se incubó a 4°C durante toda la noche. El día siguiente se centrifugó a 4000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 10000 x g otros 10 minutos, recogiendo todo el suero que finalmente se almacenó -80°C hasta su uso.



**Figura 4. Tejidos muestreados de trucha arcoíris.** Fotografía de una trucha arcoíris identificando los órganos muestreados durante esta Tesis.

### 3.5. Obtención de cultivos primarios de leucocitos de trucha

Para la obtención de cultivos primarios de leucocitos de trucha, se extrajeron los tejidos en condiciones de esterilidad a partir de truchas de 15-20 cm recién sacrificadas por sobredosis de benzocaína. Los órganos se disgregaron a través de un filtro de nylon de 100 µm de poro utilizando medio L-15 suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 µg/ml), heparina (10 unidades/ml) y 2% de FCS.

Con el objetivo de extraer los leucocitos de la piel, ésta se lavó con PBS, se cortó en trozos pequeños y se introdujo en PBS con 1mM DTT y 1mM de EDTA. Tras 15 minutos de incubación con agitación a temperatura ambiente (RT, del inglés *room temperature*), se transfirió el tejido a una solución de colagenasa (200 µg/ml) y se volvió a incubar 30 minutos en agitación a RT. En este momento, el tejido junto con la solución de colagenasa se transfirió a L-15 suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml), heparina (10 unidades/ml) y 2% de FCS y se procesó como el resto de los tejidos.

En todos los casos, las suspensiones celulares resultantes se depositaron sobre un colchón de Percoll en gradiente de 30-51% (GE Healthcare). Los gradientes se centrifugaron a 500 x g durante 30 minutos a 4°C. La interfase celular conteniendo los leucocitos se recogió con una pipeta *Pasteur*, se transfirió a un nuevo tubo y se lavó dos veces a 500 x g durante 5 minutos con L-15 con 5% de FCS. Las células se resuspendieron finalmente en L-15 con 5% de FCS, se contaron en una cámara Neubauer y se ajustaron a la concentración deseada para cada experimento.

### 3.6. Inmunohistoquímica

Se obtuvieron secciones de piel anterior y posterior de peces de aproximadamente 7-9 cm recién sacrificados, las cuales se fijaron en solución de Bouin (formaldehído al 37%, ácido pícrico a saturación y ácido acético glacial) durante 24 horas, se embebieron en parafina (Paraplast Plus, Sherwood Medica) y se seccionaron a 5 µm.

Para eliminar la parafina de los cortes, se realizaron 2 baños de 5 minutos en xileno seguidos de 3 baños de 5 minutos en etanol al 99%, 2 baños de 5 minutos en etanol al 96% y un baño de 5 minutos en agua. Para la recuperación del antígeno, se cubrieron los portaobjetos con tampón TEG (Tris-EDTA-Glucosa; pH 9) y se calentaron en el microondas durante 5 minutos a 800 W seguidos de otros 5 minutos a 480 W.

A continuación, se realizó un bloqueo mediante un baño de 30 minutos en agitación con TBT, tampón consistente en TBS 1X (Tris HCl 1M, pH=7.5) suplementado con 0.01% albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*, Sigma) y Tween-20 (Sigma) al 0.02%. Posteriormente, se bloquearon 30 minutos más con TBT suplementado con 10% de suero de cabra.



Tras realizar dos lavados con TBT, se incubaron las secciones con el anticuerpo primario, en este caso un monoclonal de ratón anti-CD3ε de trucha (cedido por Erin Bromage, Universidad de Massachusetts Dartmouth, USA), a una concentración de 10 µg/ml durante toda la noche a 4°C. El día siguiente se eliminó el anticuerpo primario mediante 4 lavados en TBT y se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario Envision HRP-labelled polymer anti mouse IgG (Dako K4001) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las muestras se lavaron con TBS y agua y después se tiñeron con carbazol [ácido acético 0,2 M (pH 5) con acetato sódico 0.2 M, 0.015% de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 0.4 g/l de carbazol (3-Amino-9-ethylcarbazole (Alfa Aesar)].

Seguidamente se lavaron los portaobjetos durante 5 minutos con agua y se tiñeron con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Finalmente, se lavaron durante 5 minutos con agua, seguidos de otros 5 minutos con agua destilada. Por último, las muestras se montaron utilizando medio de montaje acuoso Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (Dako), se examinaron con un microscopio óptico Axiolab (Zeiss) y fueron analizadas con Photoshop CS. La positividad se observó en color marrón, y se incluyeron cortes histológicos sin incubar con anticuerpo primario como controles negativos.

### **3.7. Tratamientos y diseños experimentales**

#### **3.7.1. Vitamina C**

Para analizar el efecto de la vitamina C, ácido ascórbico comercial (Sigma) se diluyó en agua Mili Q para generar existencias de concentración 0.5 M y se utilizó a los tiempos y concentraciones indicadas en cada ensayo. Para determinar la citotoxicidad de la vitamina C, se realizó un experimento para definir la viabilidad celular de células RTS11 y leucocitos de riñón anterior en presencia de diferentes concentraciones de dicha vitamina (0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 5 µM y 10 µM). Se incubaron las células durante 24, 48 y 72 horas, y posteriormente se lavaron con tampón FACS (PBS con 1% FCS y 0.5% de acida sódica), se incubaron 1 minuto con 1 µl de ioduro de propidio (10 µg/ml) (Thermo Fisher) en oscuridad e inmediatamente se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur. Los resultados obtenidos se analizaron con FlowJo 10 (TreeStar). En determinados experimentos, se estudió el efecto de la vitamina C en la repuesta transcripcional inducida por *Escherichia coli*.

Para ello, las células RTS11 o los cultivos de leucocitos de riñón se expusieron a *E. coli* o medio control con una proporción bacteria:célula de 10:1 en presencia o ausencia de 0.5  $\mu$ M de vitamina C. Después de 24 horas de incubación a 19°C, se recogieron las células en TriReagent (Invitrogen) para la posterior extracción de ARN.

### 3.7.2. Infecciones experimentales con VHSV

En los casos en los que se determinó el efecto de la infección con VHSV se utilizaron truchas arcoíris de 5-8 cm. Para llevar a cabo la infección, los animales se traspasaron a recipientes con 4 l de agua conteniendo  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml de VHSV (cepa 0771) en el caso del análisis de la distribución del sistema inmunitario en piel, y  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml de VHSV (cepa 3592B) en el caso del análisis del efecto de la dieta Protec™. Tras 1 hora en estos tanques con fuerte aireación, los peces se transfirieron a su tanque original. Los grupos control se sometieron al mismo procedimiento pero en lugar de virus se añadió el mismo volumen de medio de cultivo.

### 3.7.3. Ensayos de actividad de dietas funcionales

El efecto de la dieta funcional Protec™ suministrada por Skretting S.A. fue testado en trucha arcoíris. Esta dieta está suplementada con distintas vitaminas (fundamentalmente vitamina C y E), glucanos y extractos vegetales inmunoestimulantes. Para ello, se realizaron varios grupos formados por 20 peces de 5-6 cm cada uno. Tras un periodo de aclimatación de 15 días en tanques de 30 l se procedió al experimento. Se confinaron 3 grupos: un grupo fue alimentado con una dieta control (Nutra NP, Skretting) durante 30 días; el segundo grupo se alimentó con la dieta control durante 15 días y posteriormente se cambió a la dieta Protec™ durante los siguientes 15 días; mientras que al tercer grupo se le administró la dieta Protec™ durante los 30 días del experimento.

Tras ese mes, se realizó una infección por baño con  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml de VHSV. Después de 2 y 6 días de realizar la infección, se sacrificaron 6 animales de cada grupo por sobredosis de benzocaína para la obtención de muestras. Se obtuvo el suero a través de la extracción de sangre periférica de los animales mediante una punción en la vena caudal tal como se describió anteriormente. También se extrajeron muestras de bazo, riñón, branquia, intestino y piel, los cuales se introdujeron en TriReagent para la extracción de ARN.

### 3.8. Estudios de transcripción génica

#### 3.8.1. Aislamiento de ARN

Para evaluar la distribución de células T en la piel de la trucha, el ARN de la piel y bazo fue extraído mediante un protocolo combinado de Trizol (Invitrogen) y el kit RNeasy mini (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello, las muestras se introdujeron en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y posteriormente fueron homogeneizadas con un homogeneizador. A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo y tras agitar vigorosamente se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 12000 x g. La solución acuosa se recogió y se mezcló con el mismo volumen de etanol al 100%, para posteriormente añadirla a la columna del kit RNeasy Mini. A partir de este momento se siguió el protocolo comercial, realizando un tratamiento con DNAsa en la columna tal como se indica en el protocolo. Finalmente el ARN se eluyó con agua libre de ARNsas y se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) para posteriormente almacenarse a -80°C hasta su uso.

Para los estudios del efecto de la vitamina C o de la dieta Protec<sup>TM</sup> sobre la respuesta inmunitaria del pez, el ARN se extrajo de las muestras utilizando TriReagent (Invitrogen). Tras homogenizar los tejidos, se añadieron 200 µl de cloroformo a cada muestra. Se agitaron vigorosamente y se incubaron 5 minutos hasta observar la separación de ambas fases. Se centrifugaron las muestras 10 minutos a 15000 x g, y por último se recogió la fase acuosa a la cual se le añadió el mismo volumen de isopropanol. Cuando la extracción se realizó a partir de células, se añadió 1,2 µl de GlycoBlue (Invitrogen) por muestra al isopropanol. Tras una incubación a -80°C durante toda la noche, se centrifugaron las muestras 10 minutos a 15000 x g y se eliminó el sobrenadante.

Tras lavar el pellet con etanol al 75%, se centrifugó 10 minutos a 15000 x g y se secó a 37°C hasta eliminar todo el etanol. Se cuantificó la concentración de ARN extraído mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y se conservó a -80°C hasta su utilización. En este caso, el ADN genómico se eliminó mediante el kit RapidOut DNA Removal (Thermo Scientific) añadiendo a 1 µg de ARN, 5 µl de tampón 5X y 1 µl de DNAsa. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C se añadió 1 µl por muestra para eliminar la DNAsa.

### 3.8.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

En las muestras de ARN obtenidas a través del protocolo combinado de Trizol y el kit RNeasy Mini, la reacción de síntesis de ADN complementario se llevó a cabo con la transcriptasa reversa BioScript reverse transcriptase (Bioline). Para ello, se incubó 1 µg de ARN durante 5 minutos a 70°C con 1 µl de Oligo (dT)<sub>15</sub> (10 mM) y 1 µl de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 10mM). Tras enfriar las muestras en hielo se añadieron 4 µl de tampón comercial 5X y la enzima BioScript transcriptasa reversa (200 U/ml). A continuación, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 42°C seguidos de 5 minutos a 85°C.

Para el resto de muestras de ARN, se obtuvo el ADNc con la transcriptasa reversa RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Para ello, 1 µg de ARN se incubó durante 2 minutos a 70°C con 3.2 µl de Oligo (dT<sub>28</sub>VN) (10 mM). Tras enfriar las muestras en hielo, se añadieron 5 µl de tampón comercial 5X, 1 µl de transcriptasa reversa y 2 µl de dNTPs (10 mM). Seguidamente, las muestras se incubaron durante 1 hora a 42°C seguida de 30 minutos a 50°C y 5 minutos a 90°C. El ADNc se congeló a -20°C para posteriormente hacer ensayos de transcripción génica.

### 3.8.3. PCR a tiempo real

La evaluación de los niveles de transcripción de los diferentes genes se realizó mediante PCR a tiempo real en un LightCycler® 96 System instrument (Roche), utilizando el reactivo FastStart Essential DNA Green Master (Roche) y cebadores específicos validados previamente en el laboratorio (Tablas 2 y 3). El programa utilizado en todos los experimentos fue el siguiente: 10 minutos a 95°C y 45 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La expresión de cada gen fue normalizada frente al gen de referencia EF-1α y los niveles de expresión fueron calculados a través del método  $2^{-\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct$  se calcula restando el valor de EF-1α del gen estudiado como se ha descrito anteriormente (Cuesta et al., 2008; Wang et al., 2009). En todos los casos, se incluyeron controles negativos con la misma mezcla de reacción pero sin ADNc. La curva de disociación para cada PCR se determinó leyendo la fluorescencia en cada grado entre 60°C y 95°C para garantizar la amplificación de un único producto.

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Secuencia 3' → 5'
CATH2	ACATGGAGGCAGAAGTTCAGAAGA	GAGCCAAACCCAGGACGAGA
CD3 $\gamma\delta$	CCTGATTGGAGTAGCTGTCTAC	GCTGTA CTAGATCTGTCCATGC
CD4	CCTGCTCATCCACAGCCTAT	CTTCTCCTGGCTGTCTGACC
CD40L	GAGTGTGAGAAAGACAGCCAGTCAG	CGTTTGACAGCTTTTCCTTCAACTT
CD8	ACGACTACACCAATGACCACAACC	CAGTGATGATGAGGAGGAGGAAGA
CK9	AAGGCTCTTATGGGAAC TGC	CCACTTCTGGCTGGGATTG
CK10	ATTGCCAAGATCCTCTTCTGTGTTT	CCTGAGGCTGGTAACCTATGACAAC
CK11	GAACATTCCTTTGAGCATACTAAT	TGCACAATACTTCTCCCAT
CK12	GACATCGATGCCACTGTGTT	GGAGATGGTTCGCTCCAGAC
COX2A	CCAGTACCAGAACCGTATCGCAG	GTCCACCAGCCACCCTTCC
COX2B	CCAGTATCAGAACCGCATCTCGT	GACCTCCAGCAACCCGTCC
EF1 $\alpha$	ATCCAGAAGGAGGTCACCA	TTACGTTTCGACCTTCCATCC
EOMES	ACAACGTATTTGTTGAGGTCTGTGTT	CATCTTGTTACCTTGCATGTTGTTG
FoxP3	CCAGAACCGAGGTGGAGTGT	TGACGGACAGCGTTCTTCCA
GATA3	CCCATCGGTGCTAAACGAACA	GCTGTGGTGCTGCATTGCTT
Hepcidina	GCTGTTCTTTCTCCGAGGTGC	GTGACAGCAGTTGCAGCACCA
IFN1	AAAAC TGTGTTGATGGGAATATGAAA	CGTTTCAGTCTCCTCTCAGGTT
IFN $\gamma$	GAAGGCTCTGTCCGAGTTCA	TGTGTGATTGAGCCTCTGG
IgD	AGCTACATGGGAGTCAGTCAACT	CTTCGATCCTACCTCCAGTTCCT
IgM membrana	CCTTAACCAGCCGAAAGGG	CCTTAACCAGCCGAAAGGG
IgM secretada	CCTTAACCAGCCGAAAGGG	TGAGGTTCTATCAATGGTTCTC
IgM total	TGCGTGTTTGAGAACAAAGC	GACGGCTCGATGATCGTAAT
IgT	AACATCACCTGGCACATCAA	TTCAGGTTGCCCTTTGATTG
IL-1 $\beta$	GACATGGTGCGTTTCCTTTT	ACCGGTTTGGTGTAGTCCTG
IL4/13	CAACCCAACCAAAGATGAAGACG	CAACGGTGCACTTCTGAAGTTTG
IL-8	ATTGAGACGGAAAGCAGACG	CTTGCTCAGAGTGGCAATGA
IL17.1	CTGGCGGTACAGCATCGATA	GAGTTATATCCATAATCTTCGTATTCGGC
IL17.2	CTGGCGGTACAGCATCGATA	CAGAGTTATATGCATGATGTTGGGC
MHC II	ACACCCTTATCTGCCACGTC	TCTGGGGTGAAGCTCAGACT
Mx	AGCTCAAACGCCTGATGAAG	ACCCCACTGAAACACACCTG
Perforina	GGAACGACGACCTGTTAGGA	TCATAGGGGAGGGCACATAG
ROR $\gamma$	ACAGACCTTCAAAGCTCTTGGTT	GGGAAGCTTGACACCATCTTTG
T-bet	GTTCTGCAGTCGCTTCATAAGTACC	CTATGAATTGGGTCTCTGGGAAGAC
TCR $\alpha$	ACGCACTTGGAATTATCAACAAGA	GCTTCACATTTCTCTGAACCACTA
TCR $\gamma$	GAGGAGAACAGACGACCAGTATGA	GACATGGTGGTTGGAGTATCTTTTG
TNF $\alpha$	CCACACACTGGGCTCTTCTT	GTCCGAATAGCGCCAAATAA
VHSV-G	AAGGATCACGAGTACCCGTTCTTC	CCCAATAGACTCCCTGCCAATG

**Tabla 2. Cebadores utilizados para ver expresión génica en trucha arcoíris.** Nombre y secuencia de los cebadores de trucha arcoíris utilizados en esta Tesis.

Gen	Secuencia 5' → 3'	Secuencia 3' → 5'
CD8a	TCACCACTGGCTGCCACTTCC	GACGATGAGGAGCAGCAGAAGG
EF1a	TCGAGGCAGGTATTCCAAG	CTCGGTGGAGTCCATCTTCT
IgM total	GTGTTCCCAGTCCTAGACCTGACT	CGAGTACACTAGAAATGCAGTGATACAG
MHC II	TGTCCTCAGTGTCTCTGCTGAAG	GTATGTCTCCTCTCCACCAGTGTCT

**Tabla 3. Cebadores utilizados para ver expresión génica en rodaballo.** Nombre y secuencia de los cebadores de rodaballo utilizados en esta Tesis.

### 3.9. Técnicas de citometría de flujo

#### 3.9.1. Cuantificación de células CD8<sup>+</sup> en piel

Para cuantificar las células CD8<sup>+</sup> en la zona anterior y posterior de la piel de trucha, se extrajeron los leucocitos de las distintas zonas de la piel mediante gradientes de Percoll tal como se describe en el apartado 5. Una vez extraídos los leucocitos, se lavaron con el tampón FACS y se incubaron con un anticuerpo monoclonal de rata específico para CD8α de trucha cedido por el Dr. Uwe Fischer (Friedrich Loeffler Institut, Insel Reims, Alemania) (mAb IgG de rata, 7 µg/ml). Tras 30 minutos de incubación en hielo, se lavaron las células 3 veces con tampón FACS y se incubaron con el anticuerpo secundario R-phycoerithrin F(ab)<sub>2</sub> anti-IgG de rata (Life technologies) otros 30 minutos. Una vez lavadas las células 3 veces con tampón FACS, se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) equipado con el software CellQuestPro. Los resultados obtenidos se analizaron con FlowJo 10 (TreeStar).

#### 3.9.2. Fagocitosis

Para determinar el efecto de la vitamina C sobre la capacidad fagocítica de las células RTS11 o de los leucocitos de riñón, se plaquearon 2x10<sup>5</sup> células por pocillo en L-15 suplementado con antibióticos en una placa de 96 pocillos con las distintas dosis de vitamina C (0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM). Bien inmediatamente, o tras 24 horas de incubación a 19°C, se añadieron partículas fluorescentes (FluoSpheres® Microspheres, 1.0 µm, Crimson Red Fluorescent 625/645, 2% solids; Life Technologies) a los pocillos en una proporción de 1:10 (células:partículas). Una vez añadidas las microesferas, se incubaron las células durante 3 horas a 20°C. Con el fin de eliminar las partículas no fagocitadas, se recogieron las células y se cargaron sobre un colchón de glucosa (3.5% de BSA y 4.5% de D-glucosa en PBS).

Tras centrifugar 10 minutos a 100 x g, se recogieron las células, se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur. Los resultados obtenidos se analizaron con FlowJo 10. En algunos experimentos, con el fin de analizar la capacidad fagocítica de células IgM<sup>+</sup> de riñón, se marcaron las células con un anticuerpo monoclonal de ratón frente a la IgM de trucha (mAb 1.14 mouse IgG, acoplado a ficoeritrina, 0.1 µg/ml) (DeLuca et al., 1983), tras pasar las células por el colchón de glucosa, antes de su adquisición en el citómetro.

### 3.9.3. Ensayos de quimiotaxis a CK9

Para analizar los efectos de la vitamina C sobre la capacidad migratoria de las células RTS11 o de los leucocitos de riñón frente a la quimioquina de trucha CK9, las células se incubaron previamente con las distintas dosis de vitamina C (0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM) en medio L-15 con 5% FCS. Tras 24 horas de incubación a 19°C, se realizaron los ensayos de migración en cámaras de quimiotaxis introducidas en pocillos de placas de 24 pocillos (Costar-Corning Life Sciences). Los apartados superior e inferior de la cámara se encuentran separados por un filtro de policarbonato de 5 µm de poro en el caso de RTS11 y de 3 µm para leucocitos de trucha, de tal manera que 600 µl de medio atrayente (conteniendo 100 ng/ml de CK9 recombinante de trucha (Aquilino et al., 2016) se sitúan en la parte inferior y 100 µl de células a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml en la parte superior. Tras 2 horas de incubación a 19°C, el número de células migradas al apartado inferior de los pocillos se determinó mediante citometría de flujo, contabilizando el número de células presentes en el medio con un flujo constante durante 1 minuto. Los resultados obtenidos se analizaron con Cell Quest (BD), y la migración de células viables se determinó en base a los parámetros de tamaño (FSC, del inglés *forward scatter*) y complejidad (SSC, del inglés *side scatter*).

## **3.10. Otros ensayos inmunitarios**

### 3.10.1. Estallido respiratorio

Para determinar los efectos de la vitamina C sobre el estallido respiratorio de las células RTS11 o de los leucocitos de riñón, se dispusieron  $2 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 96 pocillos.

Tras lavar las células con PBS se resuspendieron en medio Hanks' sin rojo fenol (HBSS, Life Technologies) al cual se añadió 1 mg/ml de azul de tetrazolio (NBT, del inglés *nitro blue tetrazolium*, Sigma), así como las distintas concentraciones de Vitamina C (0  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M).

Con el fin de demostrar la especificidad de la reacción, algunos pocillos se incubaron además con 300 U/ml de Superóxido dismutasa (SOD, Sigma), enzima que bloquea específicamente la reacción. Tras 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente, se centrifugó la placa y se eliminó el sobrenadante. Se incubaron las células con metanol absoluto durante 5 minutos a temperatura ambiente y tras eliminarlo se dejaron secar los pocillos durante 30 minutos. Para finalizar, se añadió una solución compuesta por 120  $\mu$ l de KOH 2M y 140  $\mu$ l de DMSO (Dimetilsulfóxido) a cada pocillo. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente se midió la reducción de NBT a una densidad óptica (DO) de 620 nm.

### 3.10.2. Detección de anticuerpos

La cuantificación de los niveles de IgM del suero se realizó a través de la técnica de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para ello, se tapizó una placa de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de tampón bicarbonato 0,05 M conteniendo 2  $\mu$ g/ml de un anticuerpo monoclonal frente a la IgM de trucha (mAb 1.14) y se incubó a 4°C toda la noche. El día siguiente, se lavaron los pocillos 3 veces con 200  $\mu$ l de PBST (PBS con 1% Tween-20).

Posteriormente se bloquearon los pocillos con 100  $\mu$ l de PBST suplementado con 1% BSA. Tras 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron diluciones de los sueros en PBST con BSA (50  $\mu$ l por pocillo) los cuales se volvieron a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con 200  $\mu$ l de PBST. En ese momento, se añadieron a cada pocillo 50  $\mu$ l de PBST con BSA conteniendo 1  $\mu$ g/ml de otro anticuerpo monoclonal frente a la IgM de trucha (mAb 4C10) biotinilado y se volvieron a incubar las muestras 1 hora a temperatura ambiente.

Después de 3 lavados con PBST se agregaron 50  $\mu$ l de estreptavidina-HRP (0.5  $\mu$ g/ml) a cada pocillo, incubando una vez más la placas durante 1 hora a temperatura ambiente.

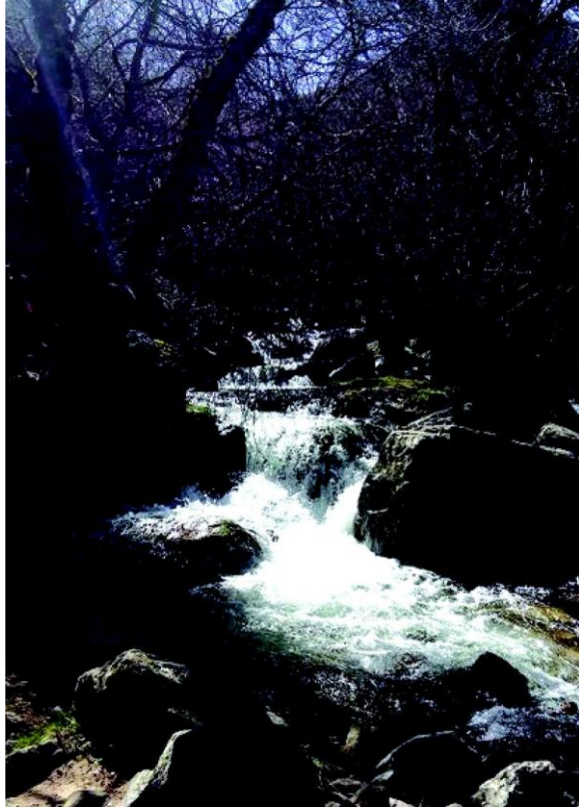


Tras otros 3 lavados en PBST, se añadieron 50  $\mu$ l de orto-fenil-dietanolamina (OPD, del inglés *o-phenylenediamine*) a una concentración de 0.4 mg/ml y 0.025  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por pocillo. A los 15 minutos, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2 M y se determinó la DO a 492 nm.

### 3.11. Análisis estadísticos

En función de los experimentos realizados (número de muestras utilizadas, grupos distintos a analizar, etc.) se llevaron a cabo diferentes análisis estadísticos, especificados en cada una de las leyendas de las figuras. De forma general, los análisis estadísticos se analizaron mediante una prueba *t* de Student verificando previamente la distribución normal de los grupos. Para el estudio del efecto de la dieta Protec<sup>TM</sup> se aplicó una prueba *t* de Student para muestras con diferente tamaño muestral. En los casos en los que se compararon varios grupos, se aplicó un análisis de varianza ANOVA seguido de un test de comparación de medias de Tukey. Los análisis se llevaron a cabo utilizando los programas Sigma Stat (Version 3.5) o Microsoft Office Excel 2010. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas con valores de *p* menores de 0,05.





# Capítulo I

## Distribución de células T en la piel y su respuesta a infecciones virales



## 4.1. Introducción

En los peces teleósteos la piel no está queratinizada, por lo tanto, las células vivas se encuentran en contacto directo con el agua, pudiendo reaccionar a la presencia de antígenos o patógenos. Así, la piel junto con las branquias, constituye la primera línea de defensa de los peces. A diferencia de los mamíferos, los peces carecen de grandes acumulaciones organizadas de linfocitos en mucosas, aunque se ha descrito en muchas especies la presencia de linfocitos de distintos tipos dispersos en ellas (Esteban, 2015).

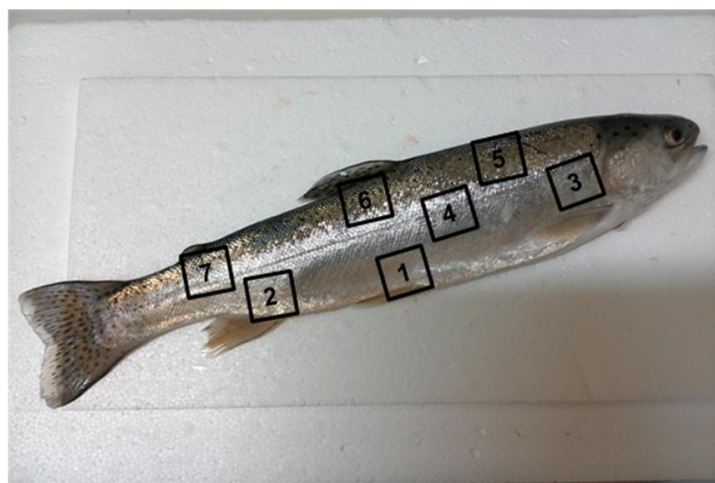
Las células B  $\text{IgT}^+$ , aunque presentes en todos los tejidos, se encuentran en mayor proporción en las mucosas (Zhang et al., 2010), donde se ha demostrado su respuesta a distintas infecciones parasitarias. Por ello, se ha postulado como una Ig especializada en respuestas de mucosas (Zhang et al., 2010; Salinas et al., 2011; Xu et al., 2016b). Sin embargo, también se han visto regulaciones de  $\text{IgT}$  a nivel sistémico (Castro et al., 2013a), por lo que su papel exacto aún no está claro. Las tres Igs se pueden encontrar en forma secretada tanto en suero como en mucus de branquia (Maki y Dickerson, 2003; Ramirez-Gomez et al., 2012; Xu et al., 2013; Xu et al., 2016b). La presencia de células B  $\text{IgM}^+$  y células  $\text{IgT}^+$  se ha demostrado en la piel (Kelly et al., 2017a; Xu et al., 2013), donde también se ha descrito la presencia de  $\text{IgM}$  e  $\text{IgT}$  secretada en el mucus (Xu et al., 2013; Kelly et al., 2017b). Sin embargo, el papel de  $\text{IgD}$  en la piel se desconoce en la actualidad.

La presencia de elevadas cantidades de células T en la piel, ha sido demostrada mediante el uso de un anticuerpo anti-CD3 de trucha y técnicas de citometría de flujo (Boardman et al., 2012), aunque se desconoce si las células inmunitarias que colonizan la piel, están distribuidas homogéneamente a lo largo de las distintas zonas del cuerpo o por el contrario, se acumulan en determinadas áreas. Algunas evidencias previas indican que las células inmunitarias en la piel no están distribuidas homogéneamente. Por ejemplo, en pez gato, se han encontrado mayores niveles de Ig cerca del opérculo y entre las aletas pectoral y anal mientras que los valores eran bajos en la piel cerca de la aleta caudal y en la parte ventral entre el opérculo y la aleta pectoral (Zilberg y Klesius, 1997). Algunas infecciones de la piel afectan de forma predominante a las regiones más posteriores (Maddocks et al., 2015; Peeler et al., 2014). Por este motivo, en este Capítulo nos propusimos estudiar la distribución de células del sistema inmunitario en las distintas regiones de la piel a través de métodos transcriptómicos, confirmados por inmunohistoquímica y citometría de flujo. Posteriormente, analizamos la respuesta de la piel a una infección con VHSV, comparando los resultados con los obtenidos en un órgano central como el bazo.

## 4.2. Resultados

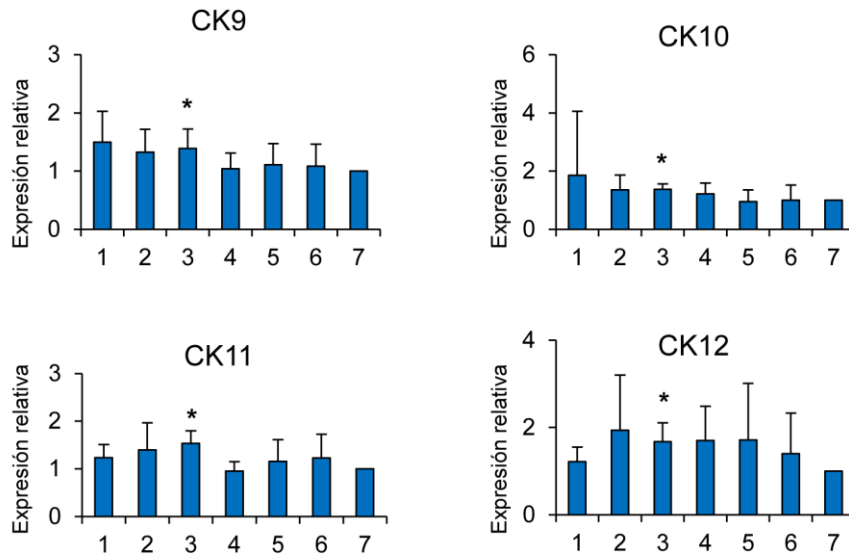
### 4.2.1 Transcripción de quimioquinas en la piel

Para caracterizar la transcripción de genes inmunitarios en las distintas zonas de la piel de trucha, se obtuvieron muestras de piel de distintas secciones tal como se indica en la Figura 5. Con ayuda de un bisturí se recortaron las zonas y se retiró el músculo adherido a cada una de ellas.



**Figura 5. Secciones de piel muestreadas en este estudio.** Esquema mostrando las zonas de piel utilizadas en este estudio para analizar los niveles de expresión de distintos genes inmunitarios. Se obtuvieron secciones de 1 cm<sup>2</sup> de piel a las que se les retiró el músculo adherido con ayuda de un bisturí.

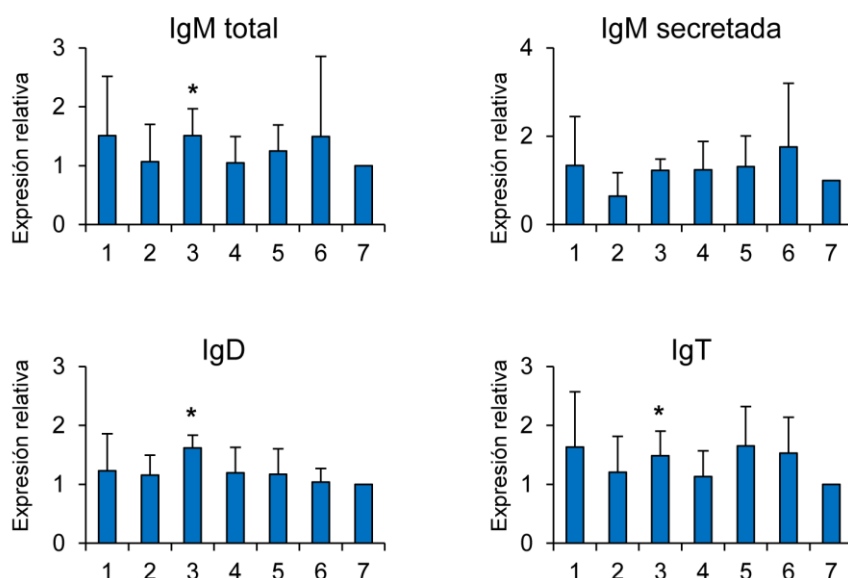
En primer lugar, estudiamos los niveles de expresión de las quimioquinas CK9, CK10, CK11 y CK12 en las diferentes secciones de la piel, ya que estudios previos han determinado que la expresión de estas quimioquinas en mucosas es elevada (Montero et al., 2011a). Como se observa en la Figura 6, nuestros resultados muestran que los niveles de ARN de todas las quimioquinas estudiadas eran significativamente mayores en la sección 3, la zona más anterior y aquella más próxima a la branquia, en comparación con la sección 7, que es la sección más posterior, cercana a la aleta caudal. En este trabajo, se utilizó la sección 7 para normalizar todos los genes estudiados, debido a que fue la sección en la que menores niveles de transcripción se observaron para todos los genes analizados.



**Figura 6. Niveles de transcripción de quimioquinas en las diferentes secciones de la piel.** Se muestrearon las secciones de piel indicadas en la Fig. 5 de peces no estimulados para extraer su ARN y analizar la transcripción de las quimioquinas CK9, CK10, CK11 y CK12 por medio de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran los niveles de expresión relativos a los del gen EF-1 $\alpha$  + desviación estándar (n=10). Dado que los valores mínimos de expresión relativa se encontraron en la sección 7 para todos los genes analizados, los valores de esta sección se fijaron a 1 y el resto de secciones fueron relativizadas frente a la sección 7 para así poder ser comparados. Las diferencias entre zonas se analizaron mediante un ANOVA indicándose con un \* las secciones con valores significativamente mayores a los observados en la sección 7 ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.2. Transcripción de inmunoglobulinas en la piel

Cuando estudiamos los niveles de transcripción de las distintas Igs, se observaron resultados similares a los observados con las quimioquinas. Los niveles de transcripción de IgM, IgD e IgT en la sección 3 fueron significativamente mayores que los hallados en la sección 7 (Fig. 7). En el caso de la IgM secretada, sus niveles de expresión de IgM secretada no fueron significativamente distintos entre las secciones analizadas, en parte debido a una gran dispersión de los valores obtenidos entre individuos (Fig. 7).



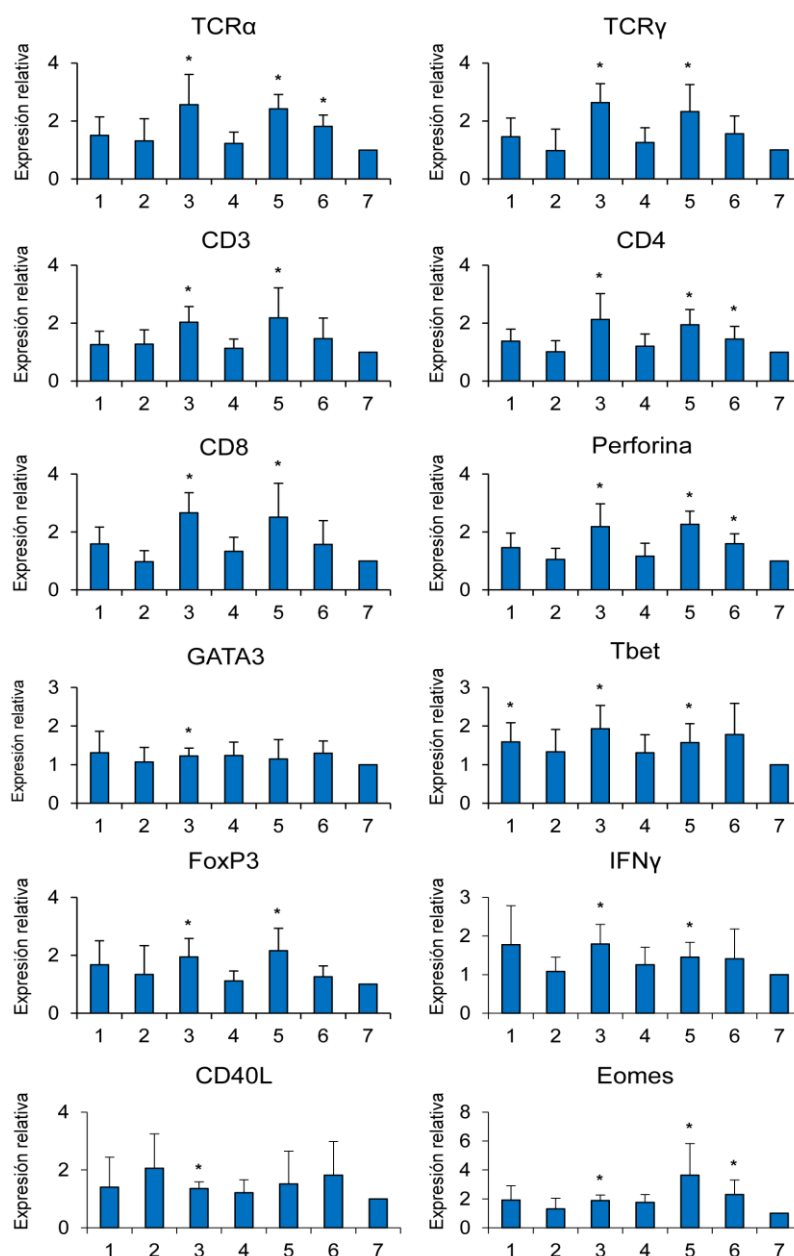
**Figura 7. Nivel de transcripción de inmunoglobulinas en las diferentes secciones de la piel.** Se muestrearon las secciones indicadas en la Fig. 5 de peces no estimulados para extraer su ARN y analizar la transcripción de IgM total, IgM secretada, IgD e IgT por medio de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran los niveles de transcripción relativos a los del gen EF-1 $\alpha$  + desviación estándar (n=10). Dado que los valores mínimos de expresión relativa se encontraron en la sección 7 para la mayoría de los genes analizados, los valores de esta sección se fijaron a 1 y el resto de secciones fueron relativizadas frente a la sección 7 para así poder ser comparados. Las diferencias entre zonas se analizaron mediante un ANOVA indicándose con un \* las secciones con valores significativamente mayores a los observados en la sección 7 ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.3. Transcripción de genes relacionados con la inmunidad de las células T en la piel

Posteriormente, estudiamos también los niveles de transcripción de varios genes relacionados con la presencia y actividad de células T en las distintas secciones de la piel. Los genes estudiados fueron TCR $\alpha$ , TCR $\gamma$ , CD3, CD4, CD8, perforina, GATA3, T-bet, FoxP3, IFN $\gamma$ , CD40L y Eomes, siendo el último una molécula clave asociada a la diferenciación de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (Takizawa et al., 2014). Los resultados obtenidos fueron similares a los observados para las Igs y las quimioquinas, es decir, los niveles de ARN fueron significativamente mayores en la sección 3 respecto a la sección 7 (Fig. 8). Además, en el caso de TCR $\alpha$ , TCR $\gamma$ , CD3, CD4, CD8, perforina, T-bet, FoxP3 e IFN- $\gamma$ , también se encontraron niveles de transcripción significativamente más elevados en la sección 5 (zona anterior cercana a las branquias) en comparación con la sección 7 (Fig. 8). Sorprendentemente, los niveles de expresión de estos genes no fueron más elevados en la zona 4 que en la zona 7, lo que podría estar indicando que a pesar de ser una zona más anterior, la línea lateral no es una zona especialmente rica en células T.



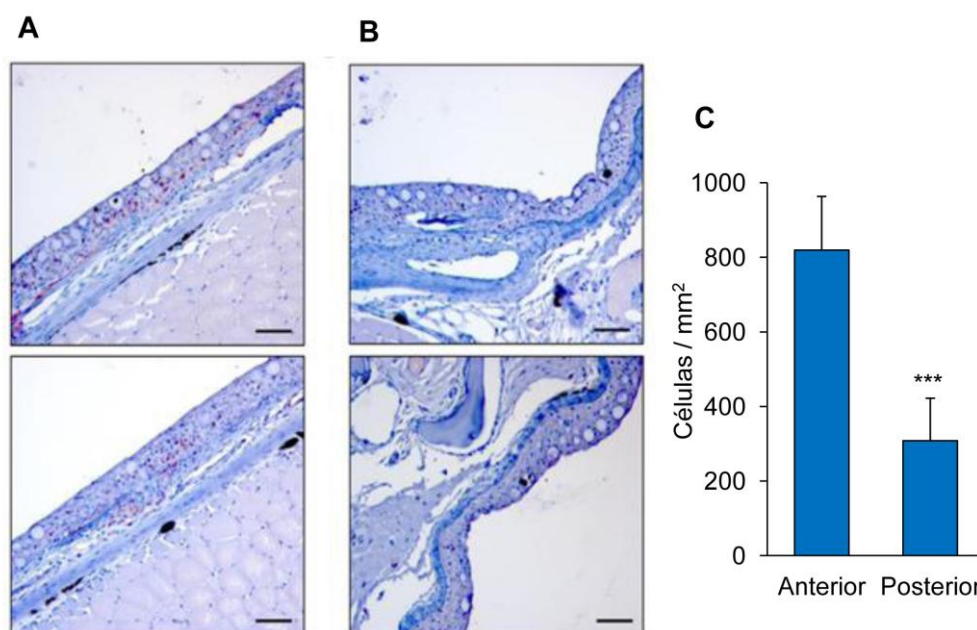
Finalmente, cabe destacar que también se obtuvieron niveles de transcripción significativamente más elevados de T-bet en la sección 1, y de TCR $\alpha$ , CD4 y perforina en la sección 6 en comparación con la sección 7 (Fig. 8).



**Figura 8. Niveles de transcripción de genes relacionados con la actividad de células T en las diferentes secciones de la piel.** Se muestrearon las secciones indicadas en la Fig. 5 de peces no estimulados para extraer su ARN analizar la transcripción de genes relacionados con la actividad de células T por medio de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran los niveles de expresión relativos a los del gen EF-1 $\alpha$  + desviación estándar (n=10). Dado que los valores mínimos de expresión relativa se encontraron en la sección 7 para la mayoría de los genes analizados, los valores de esta sección se fijaron a 1 y el resto de secciones fueron relativizadas frente a la sección 7 para así poder ser comparados. Las diferencias entre zonas se analizaron mediante un ANOVA indicándose con un \* las secciones con valores significativamente mayores a los observados en la sección 7 ( $p < 0.05$ ).

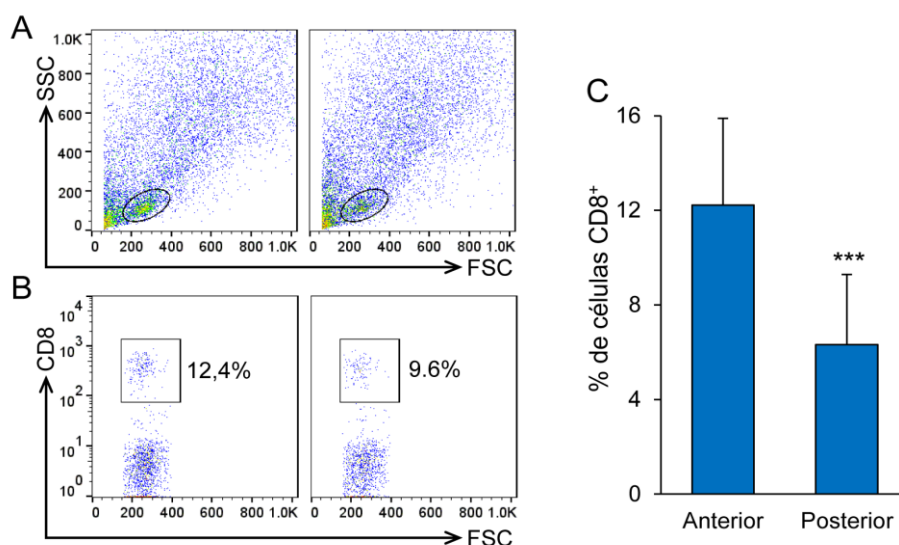
#### 4.2.4. Distribución de las células T en la piel

Los estudios transcripcionales, en los que se observaban unos niveles de ARN significativamente mayores en las zonas más anteriores cercanas a la branquia, para un gran número de genes relacionados con las células T, sugerían que la zona anterior de la piel de la trucha es más rica en células T que la zona posterior. Para corroborar esta hipótesis, decidimos analizar por inmunohistoquímica la presencia de células  $CD3^+$  en muestras de piel obtenidas de la parte anterior y posterior de la trucha (Fig. 9). En la Figura 9A se observa la presencia de múltiples células T  $CD3^+$  en la epidermis de una zona anterior del pez, mientras que en la Figura 9B podemos ver como en la zona posterior sólo se detectan unas cuantas células T  $CD3^+$  aisladas a lo largo de la capa basal. Cuantificando el número de células visibles en distintos campos para varios individuos, determinamos que la diferencia en número de células T  $CD3^+$  era significativa entre ambas regiones (Fig. 9C).



**Figura 9. Distribución de células  $CD3^+$  en las zonas anterior y posterior de la piel.** Detección mediante inmunohistoquímica de células  $CD3^+$  en diferentes áreas de la piel anterior (A) y posterior (B). Tinción realizada con Hematoxilina de Mayer. La escala representa 100  $\mu m$ . (C) El número total de células  $CD3^+$  de cada sección se calculó mediante el programa Image J (NIH). La gráfica representa el número medio de células por  $mm^2$  en cada zona + desviación estándar ( $n=10$ ). Se aplicó la prueba  $t$  de Student para muestras pareadas donde \*\*\* señala las diferencias significativas en el número de células  $CD3^+$  en las dos áreas ( $p<0.001$ ).

Mediante citometría de flujo, determinamos el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> presente en las zonas anterior y posterior de la piel. Nuestros resultados mostraron que mientras que en la zona posterior el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> constituye un 6% de los linfocitos, en la zona anterior este porcentaje aumenta hasta un 12% (Fig. 10). Además, este porcentaje de células CD8<sup>+</sup> en la zona anterior de la piel fue mucho más elevado que el descrito con anterioridad en bazo, donde sólo un 2.3% de la población linfocitaria lo constituyen linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Takizawa et al., 2011a).



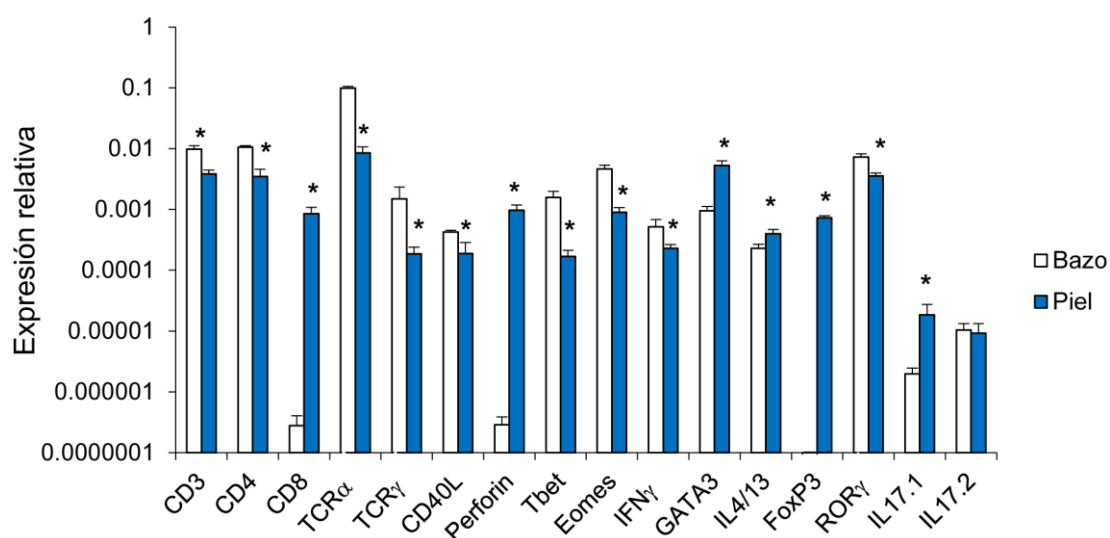
**Figura 10. Cuantificación de células CD8<sup>+</sup> en las secciones anterior y posterior de la piel.** Se aislaron los leucocitos de piel, se marcaron con anti-CD8 $\alpha$  y se determinó el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo en la región anterior (A) y en la región posterior (B). Para cada sección se muestran los perfiles FSC/SSC (fila superior) y las regiones de linfocitos seleccionadas (fila inferior). La grafica muestra los porcentajes medios de células CD8<sup>+</sup> de 3 experimentos independientes (n=9 peces, media + desviación estándar). Se aplicó la prueba *t* de Student para muestras pareadas donde \*\*\* señala las diferencias significativas en el número de células CD8<sup>+</sup> en las dos áreas ( $p < 0.001$ ).

#### 4.2.5. Comparación de los niveles de transcripción de células T en piel y bazo

Los experimentos anteriores en los que se analizó el nivel de expresión de distintos genes inmunitarios relacionados con células T en la piel, mostraban unos niveles relativos de transcripción muy elevados, lo que parecía sugerir que la piel y especialmente su zona anterior es un tejido rico en células T. Para comprobar esta afirmación se compararon los niveles de transcripción de varios genes relacionados con la inmunidad de las células T, en dicha sección de la piel y los observados en el bazo de animales no estimulados.

Pese a que los niveles de transcripción de CD3, CD4, TCR $\alpha$ , TCR $\gamma$ , CD40L, T-bet, Eomes, IFN- $\gamma$  y ROR $\gamma$  fueron significativamente mayores en el bazo respecto a la piel, los elevados niveles obtenidos en general, sugieren que la presencia de células T es importante en ambos tejidos (Fig.11). Además, en el caso de algunos genes como CD8 y perforina, los valores de transcripción fueron mayores en la piel respecto al bazo, lo que parece indicar que la presencia de células T citotóxicas activadas en la piel es mayor que en el bazo (Fig. 11), lo cual concuerda con los resultados anteriores obtenidos mediante citometría de flujo.

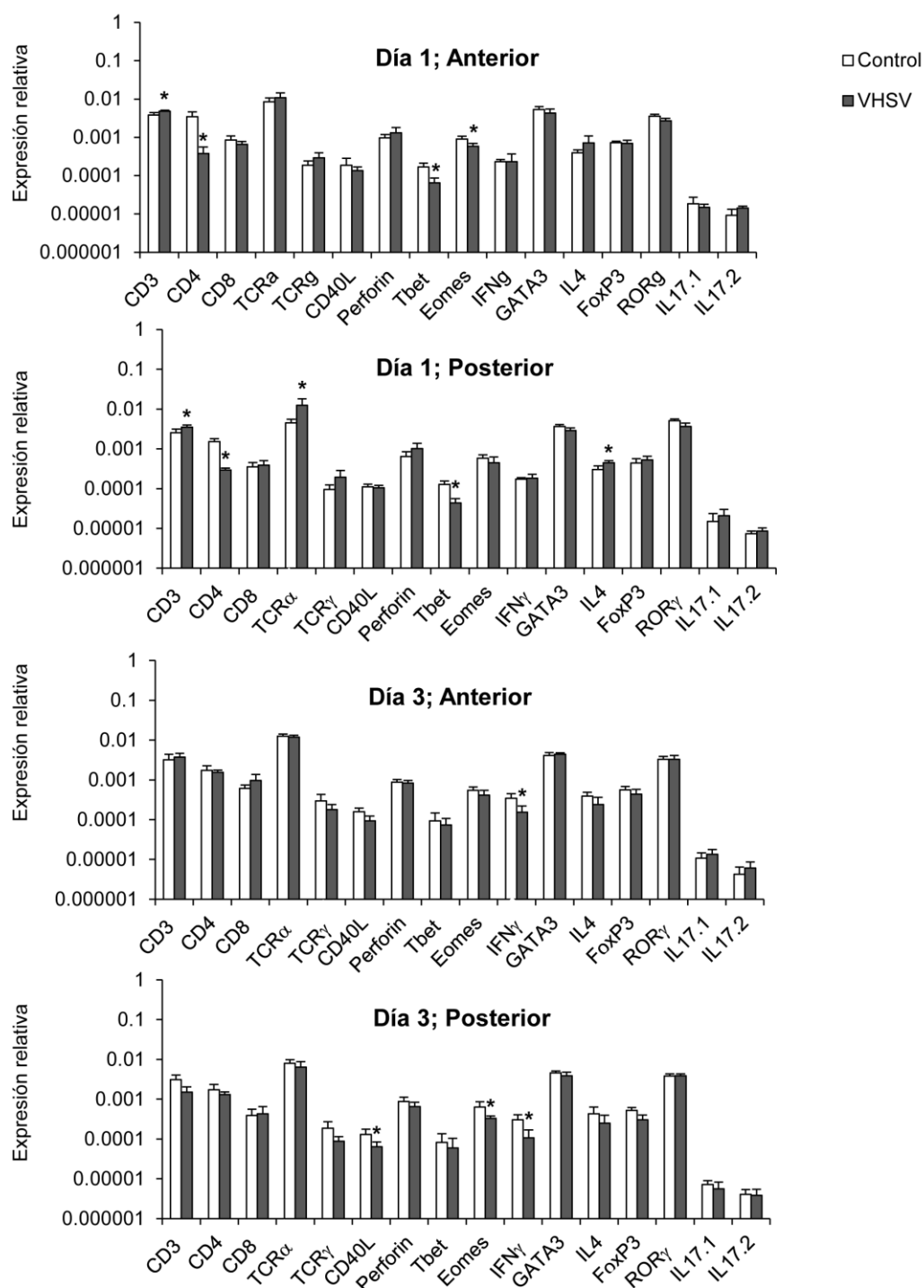
Asimismo, los genes relacionados con células Treg (FoxP3) y Th17 (IL17.1) se expresaban significativamente más en piel que en bazo (Fig. 11), lo que podría indicar una mayor presencia de estos subtipos celulares en la piel. Finalmente, los niveles de GATA3 y IL4/13 también fueron significativamente mayores en la piel respecto al bazo, lo que sugiere que la inmunidad en la piel está más inclinada a un perfil Th2, típico de mucosas que Th1 (Takizawa et al., 2011b).



**Figura 11. Comparación de la transcripción de genes relacionados con la actividad de células T en bazo y piel.** Los niveles de transcripción de genes relacionados con la actividad de células T fueron analizados mediante PCR en tiempo real en muestras de bazo y secciones de piel correspondientes a la sección 3 tal como se muestra en la Fig. 5. Los datos representados muestran la expresión media de los distintos genes normalizados con el gen constitutivo EF-1 $\alpha$  + desviación estándar (n=5). Se aplicó la prueba *t* de Student para muestras pareadas donde \* señala las diferencias significativas entre el bazo y la piel ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.6. Efectos de VHSV en la transcripción de genes relacionados con células T en la piel

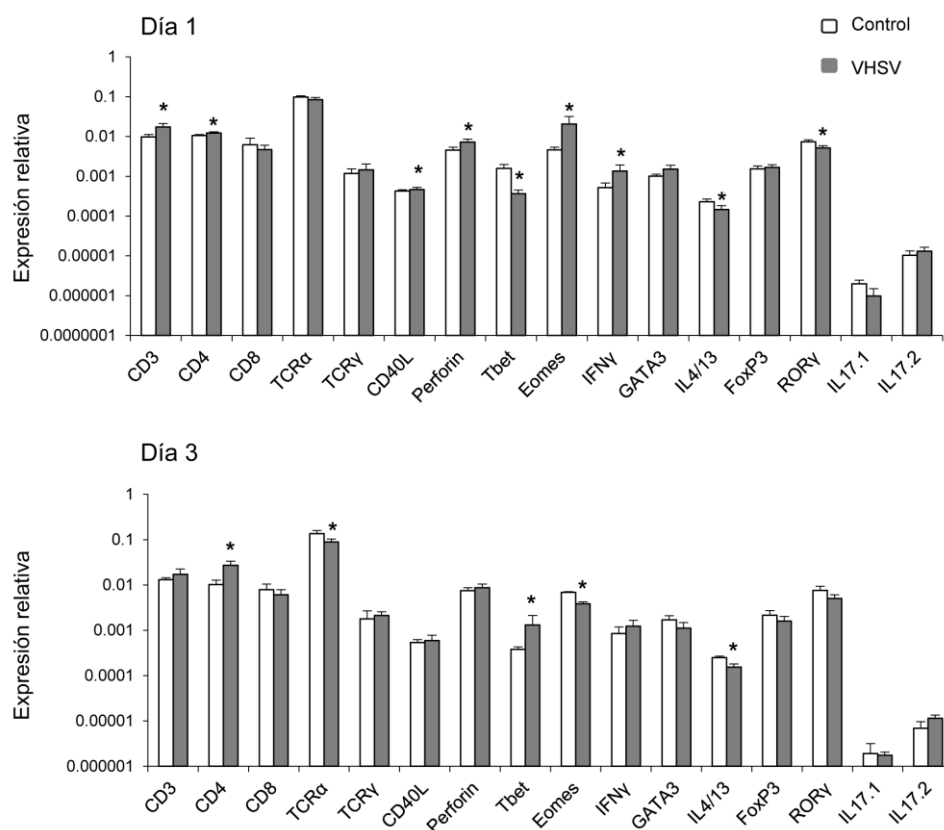
Las células T juegan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria frente a infecciones virales, por lo que dada la elevada presencia de linfocitos T en la piel de trucha, quisimos estudiar cómo se regulan estos genes relacionados con la inmunidad de las células T en la piel frente a una infección con un agente viral, como VHSV. Dado que nuestros resultados anteriores demostraban que la distribución de las células T no es homogénea en la piel, se estudiaron los efectos de VHSV en las secciones 3 y 7 como representación de la parte anterior y posterior de la piel la trucha. A día 1 después de realizar la infección, VHSV provocó la disminución de los niveles de transcripción de CD4, CD8, T-bet, Eomes en la zona anterior y ocasionó una disminución similar de los niveles de CD4 y T-bet en la región posterior, en cambio, indujo los niveles de CD3, TCR $\alpha$  y IL4/13 (Fig. 12). Estos resultados nos indican que el virus es capaz de modular la funcionalidad de los linfocitos T de la piel, pero con diferencias según la zona. Tres días después de la infección, en la sección 3 únicamente observamos una disminución de los niveles de ARN de IFN- $\gamma$  en respuesta a VHSV, mientras que en la sección posterior, además de esta disminución de los niveles de IFN- $\gamma$  también se observó una disminución de CD40L y Eomes (Fig. 12).



**Figura 12. Niveles de transcripción de genes inmunitarios característicos de linfocitos T en la piel en respuesta a VHSV.** Los peces se infectaron con VHSV por baño ( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml), mientras que los peces control fueron tratados en las mismas condiciones en ausencia de virus. Después de 1 y 3 días de la infección, se sacrificaron 6 truchas de cada grupo y se extrajeron las secciones 3 y 7 de piel representadas en la Fig. 5 Se determinaron los niveles de transcripción de los distintos genes inmunitarios a través de PCR en tiempo real. Los datos representados muestran la expresión media de los distintos genes normalizados con el gen constitutivo EF-1 $\alpha$  + desviación estándar (n=5). Se aplicó la prueba *t* de Student para muestras pareadas donde \* señala las diferencias significativas entre los valores obtenidos en los peces controles y los infectados con VHSV ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.7. Efectos de VHSV en la transcripción de genes relacionados con células T en el bazo

Con el fin de comparar la respuesta que el virus provocó en la piel con la desencadenada en el bazo, estudiamos los niveles de expresión de genes relacionados con células T en el bazo de los peces infectados con VHSV y sus respectivos controles. En este caso, a día 1 tras la infección se observaron incrementos significativos de los niveles de transcripción de CD3, CD4, CD40L, perforina, Eomes e IFN- $\gamma$  mientras que disminuyeron significativamente los niveles de expresión de T-bet e IL4/13 en respuesta a VHSV (Fig. 13). Tras 3 días de la infección, se mantuvo el aumento de los niveles de ARN de CD4, así como de T bet. En este momento, VHSV también provocó la disminución significativa de los niveles de ARN de TCR $\alpha$ , Eomes e IL4/13 (Fig. 13).



**Figura 13. Niveles de transcripción de genes inmunitarios característicos de linfocitos T en el bazo en respuesta a VHSV.** Los peces fueron infectados con VHSV tal como se describe en la leyenda de la Fig. 12. Después de 1 y 3 días de realizar la infección, se sacrificaron 6 truchas de cada grupo y se extrajo el bazo. Se determinaron los niveles de transcripción de los distintos genes inmunitarios a través de PCR en tiempo real. Los datos representados muestran la expresión media de los distintos genes normalizados con el gen constitutivo EF-1 $\alpha$  + desviación estándar (n=5). Se aplicó la prueba *t* de Student para muestras pareadas donde \* representa las diferencias significativas en los niveles de expresión obtenidos en peces infectados por VHSV frente a los observados en peces no infectados ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.8. Distribución de algunos tipos celulares en rodaballo

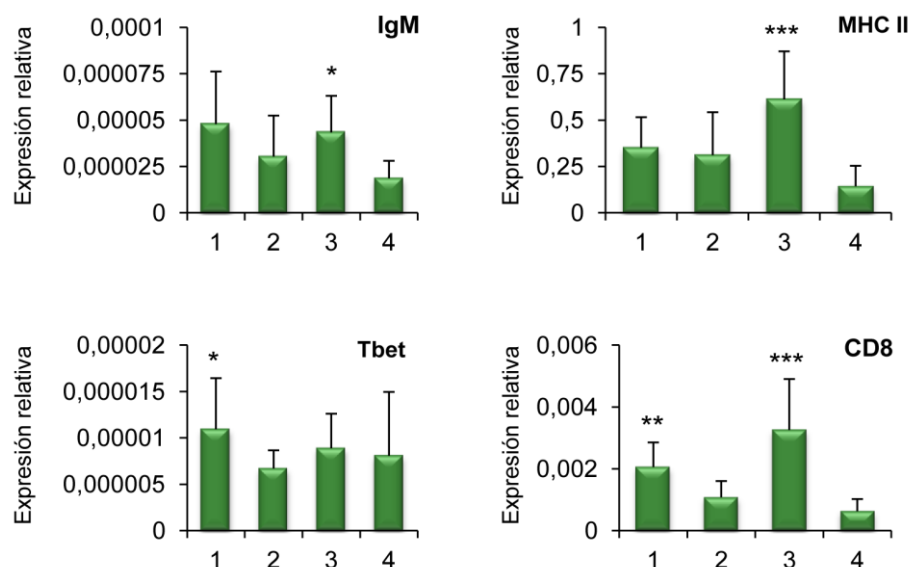
Una vez demostrado que las células T no se distribuyen de forma homogénea en la piel de la trucha arcoíris, sino que su presencia es mayor en las secciones anteriores, quisimos analizar si dicho resultado era extrapolable a otras especies de peces, incluyendo peces planos en los que la natación sigue un patrón completamente distinto. Para ello, estudiamos los niveles de expresión de algunos genes inmunitarios en distintas secciones de piel de rodaballo (*Scophthalmus maximus*). En este caso se eligieron una sección anterior y otra posterior de piel tanto en la región dorsal como en la ventral, tal como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14. Zonas de piel de rodaballo analizadas en el estudio.** Esquema de las zonas de piel que se han utilizado en este estudio. Se extrajeron secciones de piel de 1 cm<sup>2</sup>, retirando el músculo de la piel con ayuda de un bisturí.

Los resultados obtenidos fueron ligeramente diferentes a los hallados anteriormente en trucha arcoíris. En el caso de IgM y MHC II sólo la sección anterior ventral expresaba mayores niveles de ARN en comparación con la región posterior ventral utilizada para comparar los resultados (Fig. 16). En el caso de T-bet, los niveles de transcripción fueron mayores en la sección 1 (anterior dorsal) frente al resto de secciones, mientras que en el caso de CD8, los niveles de ARN fueron más elevados en las secciones situadas en la parte anterior del pez (1 y 3) (Fig. 15). Aun siendo los niveles de expresión de CD8 algo mayores en la región anterior ventral que la anterior dorsal, la diferencia en el nivel de ARN de ambas zonas no fue significativo (Fig. 15).





**Figura 15. Niveles de transcripción de genes inmunitarios en la piel de rodaballo.** Se analizaron los niveles de transcripción de distintos genes inmunitarios a través de PCR en tiempo real en muestras de piel correspondientes a las secciones indicadas en la Fig. 14. Los datos representados muestran la expresión media de los distintos genes normalizados con el gen constitutivo EF-1 $\alpha$  + desviación estándar (n=8). Se aplicó la prueba *t* de Student para muestras pareadas donde \* representa las diferencias significativas en los niveles de expresión obtenidos en las distintas secciones frente a los observados en la sección 4 ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Discusión

En este Capítulo hemos demostrado que la piel de trucha es un tejido rico en células T, ya que los niveles de transcripción de genes relacionados con la diferenciación y activación de estas células, son comparables a los que se obtienen en órganos inmunitarios secundarios como el bazo. Esta presencia tan elevada de células T en una mucosa como la piel podría ser debida a que los peces carecen de nódulos linfáticos. En estas condiciones, la mucosa podría estar actuando como órgano linfóide secundario donde encontramos células B y T, que se activan directamente en estos tejidos a nivel local.

En nuestro trabajo, hemos corroborado que las células CD3<sup>+</sup> se localizan en la epidermis de la trucha, lugar donde también se ha localizado previamente las células B IgM<sup>+</sup> de la piel (Chettri et al., 2014). Anteriormente se había descrito la presencia de células CD8<sup>+</sup> en la epidermis de trucha, pero debido a que recientemente nuestro grupo identificó una población de DCs en la piel que expresa CD8 en su superficie (Granja et al., 2015), utilizando únicamente CD8 no es posible diferenciar entre DCs y linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Por lo tanto, mediante el uso de CD3, marcador específico de linfocitos T, podemos estimar mejor el número de células T presentes en un tejido. Además, los niveles de transcripción de marcadores relacionados con la diferenciación y actividad de distintas subpoblaciones de linfocitos T, nos permitieron valorar qué subtipos de células T se encuentran más representados en la piel en condiciones de homeostasis.

Estudios previos realizados en trucha revelaron que los niveles de transcripción de GATA3 e IL-4/IL-13 eran mayores en piel, branquias y timo en comparación con el bazo (Takizawa et al., 2011b). Nuestros resultados confirman dichos trabajos realizados anteriormente, ya que también encontramos los niveles de GATA3 e IL-4/IL-13 mucho más elevados en la piel que en el bazo. Estos resultados parecen indicar que, en condiciones fisiológicas, las células T de la piel tienen mayoritariamente un perfil Th2, el más representativo en mucosas (Paul, 2010). Sin embargo, también es posible que existan en la piel otras subpoblaciones de linfocitos Th, ya que los niveles de transcripción de FoxP3 e IL-17.1 fueron más elevados en la piel que en el bazo, sugiriendo una presencia importante de células Treg y Th17 (Wan y Flavell, 2009), probablemente para mantener la tolerancia en la periferia. Asimismo, en este trabajo también observamos niveles de ARN de CD8 y perforina mucho más elevados en piel que en bazo, indicando una presencia importante de células T CD8<sup>+</sup> en este tejido. En correlación con estos resultados, el porcentaje de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> determinados por citometría de flujo fue mucho mayor que los porcentajes que se habían descrito previamente en el bazo (Takizawa et al., 2011a). Todos estos resultados parecen indicar que existen diferentes tipos de linfocitos T localizados en la epidermis en condiciones fisiológicas, esperando ser activados en respuesta a patógenos acuáticos.

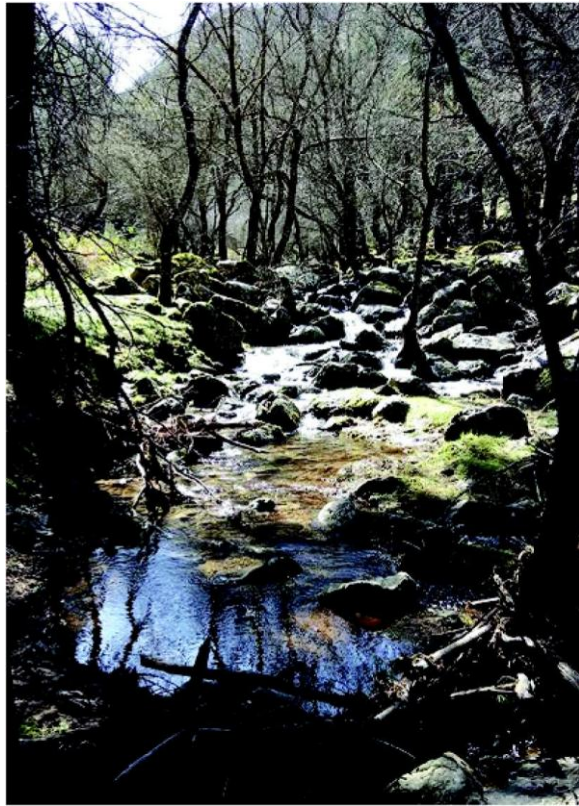
Igualmente, hemos demostrado que las células T no están distribuidas de forma homogénea por la piel, sino que están polarizadas hacia las secciones situadas en la parte anterior del pez. Esto ha sido confirmado por PCR en tiempo real, y también por medio de inmunohistoquímica y citometría de flujo. La razón de esta distribución de las células inmunitarias a lo largo de la piel se desconoce, pero podría ser consecuencia de la cercanía del timo (órgano de maduración de linfocitos T), o del tejido inmunológico asociado a branquias (GALT), en el que la presencia de células T es muy importante (Koppang et al., 2010). De esta forma, las células T colonizarán la piel partiendo desde el timo, poblando prioritariamente las zonas más cercanas. Otra hipótesis que explicaría la distribución heterogénea de las células T en la piel, podría ser debida a la preferencia de las células inmunes por la parte anterior del pez sea consecuencia de la natación de los peces, ya que el encuentro con los patógenos se realiza de forma frontal, y por ello el pez necesita en estas

áreas mayor presencia de células inmunitarias. Con el fin de comprobar si esta última hipótesis era verdadera, realizamos un ensayo similar en un pez plano como el rodaballo, estudiando en este caso la distribución de algunos genes en secciones anteriores y posteriores de piel. En rodaballo, los niveles de transcripción de T-bet fueron más elevados en la zona anterior dorsal, mientras que los niveles de expresión de CD8 fueron más elevados en todas las regiones anteriores, tanto dorsales como ventrales. Por lo tanto, dado que la preferencia de las células T por las zonas más anteriores de la piel se encuentra tanto en trucha como en el rodaballo, a pesar de la diferente forma del cuerpo, profundidad, tipo de natación y hábitat, parece más probable que la razón por la que las células T colonizan prioritariamente zonas anteriores, sea por su proximidad al timo y otros órganos de maduración de células T como el GALT. En este contexto de mayor número de células T en las zonas anteriores de la piel, es posible que las células B también se movilicen de forma prioritaria a estas zonas, para estar en contacto y así realizar la presentación antigénica y para facilitar el comienzo de la respuesta inmunitaria. En este sentido, en nuestro trabajo hemos encontrado niveles de transcripción de IgM, IgD e IgT mayores en la sección cercana al opérculo donde el tejido está enriquecido en células T. Además, estudios previos habían determinado que la presencia de IgM en el mucus cerca de las branquias era mayor que en mucus recogidos de otras zonas de la piel (Zilberg y Klesius, 1997). La migración de linfocitos B hacia áreas ricas en linfocitos T podría estar mediada por la acción específica de las quimioquinas, ya que también hemos visto mayores niveles de expresión de quimioquinas específicas de mucosas en dichas zonas. A pesar de que esta hipótesis debe ser confirmada, sabemos que algunas de estas quimioquinas tienen la capacidad de atraer a linfocitos B; (Aquilino et al., 2016; Montero et al., 2011b).

Esta distribución polarizada de las células inmunitarias en la piel, podría tener consecuencias en las respuestas inmunitarias de la piel frente a patógenos, y podría ser la clave para entender por qué no es común observar lesiones en zonas anteriores de la piel (Oidtmann et al., 2013). Por ejemplo, la enfermedad denominada PSD (del inglés, *puffy skin disease*) de etiología desconocida, se caracteriza por provocar lesiones cutáneas, pérdida de pigmentación y petequias en los peces. Estas lesiones siempre empiezan en la mitad del tercer flanco, nunca en la parte anterior y siempre incluyendo la línea lateral (Maddocks et al., 2015; Peeler et al., 2014), donde nosotros también hemos encontrado menor cantidad de células T. Una vez hemos descrito la abundancia de células T en el SALT, estudiamos cómo el contacto con un virus presente en el agua puede modular los niveles de transcripción de marcadores asociados a esas células en la piel.

Observamos que la infección por baño con VHSV provoca la modulación de varios de estos factores, demostrando que las células T de la piel responden a la presencia del virus. Además, encontramos diferencias en la regulación de los linfocitos T dependiendo del área de la piel escogida y el tiempo de infección. A día 1 tras la infección, pese a tener un incremento general de los niveles de CD3 que sugieren una migración de células T a través de la piel, los niveles de CD4 se reducen drásticamente. Esta reducción de los niveles de CD4 está relacionada con un descenso del número de linfocitos CD4<sup>+</sup>, ya que los niveles de transcripción de esta molécula no se regulan en las células Th (Glimcher y Murphy, 2000). El descenso de los niveles de expresión de T-bet, CD40L e IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección con VHSV apoya dicha hipótesis. El hecho de que los niveles de ARN de CD4 aumenten de forma significativa en el bazo a estos mismos tiempos, nos podría estar indicando un flujo de linfocitos Th desde la piel al bazo en respuesta a VHSV. Por otro lado, en respuesta a VHSV, los niveles de IFN- $\gamma$  bajan en piel pero suben en bazo sugiriendo una activación de la respuesta Th1 en el bazo. Una respuesta Th1 en bazo sería beneficiosa para el hospedador, ya que las células Th1 juegan un papel crucial en la eliminación de virus, y mejoran la actividad de las células T citotóxicas (Maloy et al., 2000). La función de las células T citotóxicas también aparece regulada en respuesta a VHSV a través de la transcripción de Eomes, que disminuye en la piel mientras que sus niveles aumentan en el bazo a día 1 después de la infección, como ocurre también con la perforina.

Es muy probable que la regulación de los factores moduladores de la respuesta de células T en la piel, dependa del tipo de patógeno. Sin embargo, algunos estudios anteriores también describieron la modulación de alguno de estos factores de células T en la piel de peces en respuesta a infecciones parasitarias. Por ejemplo, los niveles de ARN de IFN- $\gamma$  en la piel se incrementan en trucha en respuesta a la infección con *Gyrodactylus salaris*, aunque en este caso los niveles de ARN de CD4 o CD8 no aumentan significativamente tras la infección (Jorgensen et al., 2009), lo que podría estar indicando en este caso que otro tipo celular como las DCs son responsables de la producción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, *Ichthyobodo necator* también es capaz de incrementar los niveles de IFN- $\gamma$  en piel, aunque en este caso GATA3 y CD4 también se incrementan significativamente (Chettri et al., 2014). Todos estos estudios junto con el nuestro, manifiestan la importancia de la actividad de las células T en la piel de peces.



## **Capítulo II**

# **Efecto de dietas suplementadas en la inmunidad de mucosas**



## 5.1. Introducción

Actualmente en la acuicultura, existe un gran interés por la utilización de dietas suplementadas con sustancias inmunomoduladoras o inmunoestimulantes, que mejoren el estado inmunológico de los peces y los hagan más resistentes a enfermedades. De esta forma, no sólo se optimiza la nutrición de los animales, sino que se contribuye a controlar las patologías complementando las dietas con productos naturales (Lanes et al., 2012; Lokesh et al., 2012; Oliva-Teles, 2012).

La empresa Skretting produce en la actualidad una dieta suplementada denominada Protec<sup>TM</sup>. Dicho pienso contiene numerosos ingredientes funcionales, entre los que se incluyen dosis optimizadas de vitaminas y minerales,  $\beta$ -glucanos y otros extractos vegetales que favorecen el funcionamiento del sistema inmunitario. Estudios realizados por la propia empresa han demostrado que Protec<sup>TM</sup> es capaz de mejorar la reacción inmunitaria sistémica y local en la piel, mejorando la producción de mucus, acelerando el proceso de cicatrización y recuperando la integridad de la piel (revista Informa Skretting summer 2014 n°17). Además, se ha visto en distintas especies que la administración de Protec<sup>TM</sup>, disminuye la replicación viral de patógenos tales como SAV o nodavirus. Si bien existen pautas de administración marcadas por la empresa para la utilización de Protec<sup>TM</sup>; en acuicultura existe un cierto debate acerca de cuál debe de ser el tiempo de administración de la dieta, para la obtención de unos resultados óptimos. En el intestino son frecuentes los fenómenos de tolerancia; es decir, la ausencia específica de respuesta del sistema inmunitario frente a un antígeno, ya sea propio o extraño, inducida por el contacto continuado con dicho antígeno. Por este motivo, el tiempo de administración es clave para conseguir perfectos resultados, ya que la administración continuada de inmunoestimulantes puede resultar en su falta de eficacia, como consecuencia de mecanismos de tolerancia.

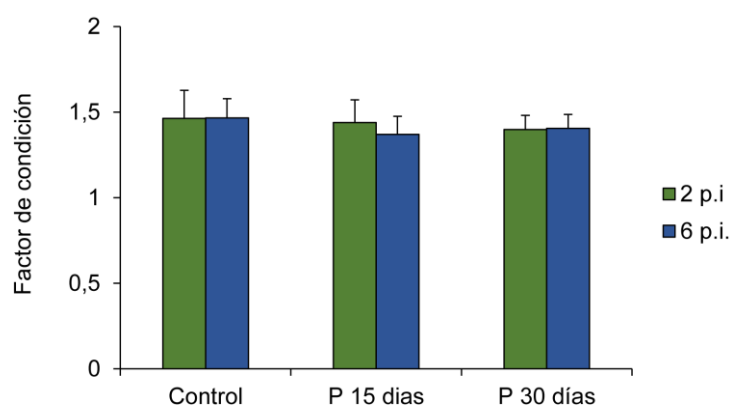
En este Capítulo, quisimos analizar los efectos de la administración de Protec<sup>TM</sup> en trucha arcoíris, y comparar los resultados obtenidos tras suministrarla durante 15 o 30 días. Al finalizar estos plazos, los peces se infectaron con VHSV o se mantuvieron sin infectar, para posteriormente estudiar los niveles de transcripción de distintos genes implicados en funciones inmunitarias en riñón, intestino, branquia y piel. Asimismo, estudiamos en estos peces, los niveles de anticuerpos naturales presentes en suero, así como la carga viral en riñón, bazo, intestino y branquia tras la infección.

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Factor de condición

En este Capítulo se analizan los efectos producidos por una dieta control (Nutra MP<sup>TM</sup>) y otra dieta suplementada (Protec<sup>TM</sup>) en ausencia de infección y tras una infección por baño con VHSV. Para ello, un grupo de peces se alimentó con la dieta control durante 30 días; a otro grupo se le suministró la dieta control durante 15 días y posteriormente se le cambió a la dieta Protec<sup>TM</sup> durante otros 15 días, y un tercer grupo se alimentó con Protec<sup>TM</sup> durante 30 días. Finalmente la mitad de peces de cada grupo fueron infectados por baño con VHSV, mientras que la otra mitad se mantuvo sin infectar. Para determinar el estado inmunitario de los peces, las muestras se extrajeron pasados 2 y 6 días de la infección.

Tras el experimento, se procedió a pesar y medir todos los animales para determinar su factor de condición (FC). El FC es un parámetro que determina el estado en el que se encuentran los peces, consistente en la relación que existe entre el peso y la talla siendo su fórmula la siguiente:  $FC = (masa / longitud^3) * 100$ . Un valor por debajo de 1 indica problemas en la nutrición de los peces. En la Figura 16, se representa el FC de todos los grupos antes y después de la infección; donde se puede observar que ni la dieta Protec<sup>TM</sup> ni la infección con VHSV modificaron el FC de los peces.



**Figura 16. Factor de condición de los peces utilizados en este experimento.** Mediante técnicas biométricas se determinaron la longitud y la masa de cada animal, representándose en la gráfica, la media + desviación estándar del FC de todos los grupos a 2 y 6 días tras la infección (n=7). La prueba *t* de Student aplicada no mostró diferencias significativas entre los grupos analizados.



### 5.2.2. Efecto de la dieta en la transcripción de IgM en riñón, intestino, branquia y piel

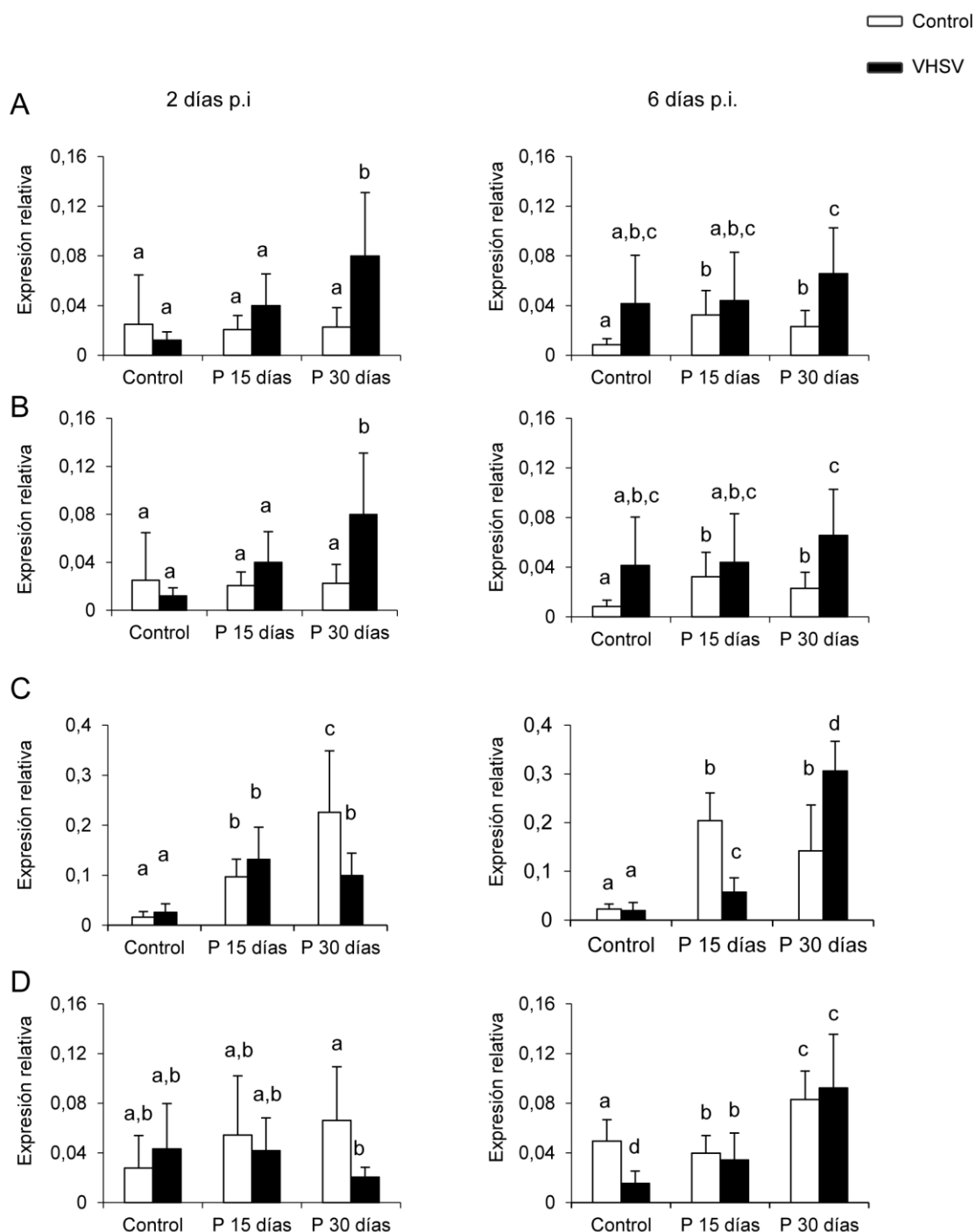
En ausencia de infección, los peces alimentados con la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 15 o 30 días mostraron niveles de transcripción de IgM mayores en riñón, intestino, branquia y piel, respecto a los peces alimentados con la dieta control a día 6 post-infección. Esta diferencia sólo fue obtenida en las branquias en el caso de los peces muestreados a día 2 (Fig. 17).

Tras la infección con VHSV, sólo los peces a los que se les suministró la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días fueron capaces de aumentar significativamente sus niveles de transcripción de IgM en respuesta al virus. Estas diferencias fueron detectadas en riñón e intestino a día 2 post-infección y en riñón, intestino y branquia a día 6 post-infección (Fig. 17).

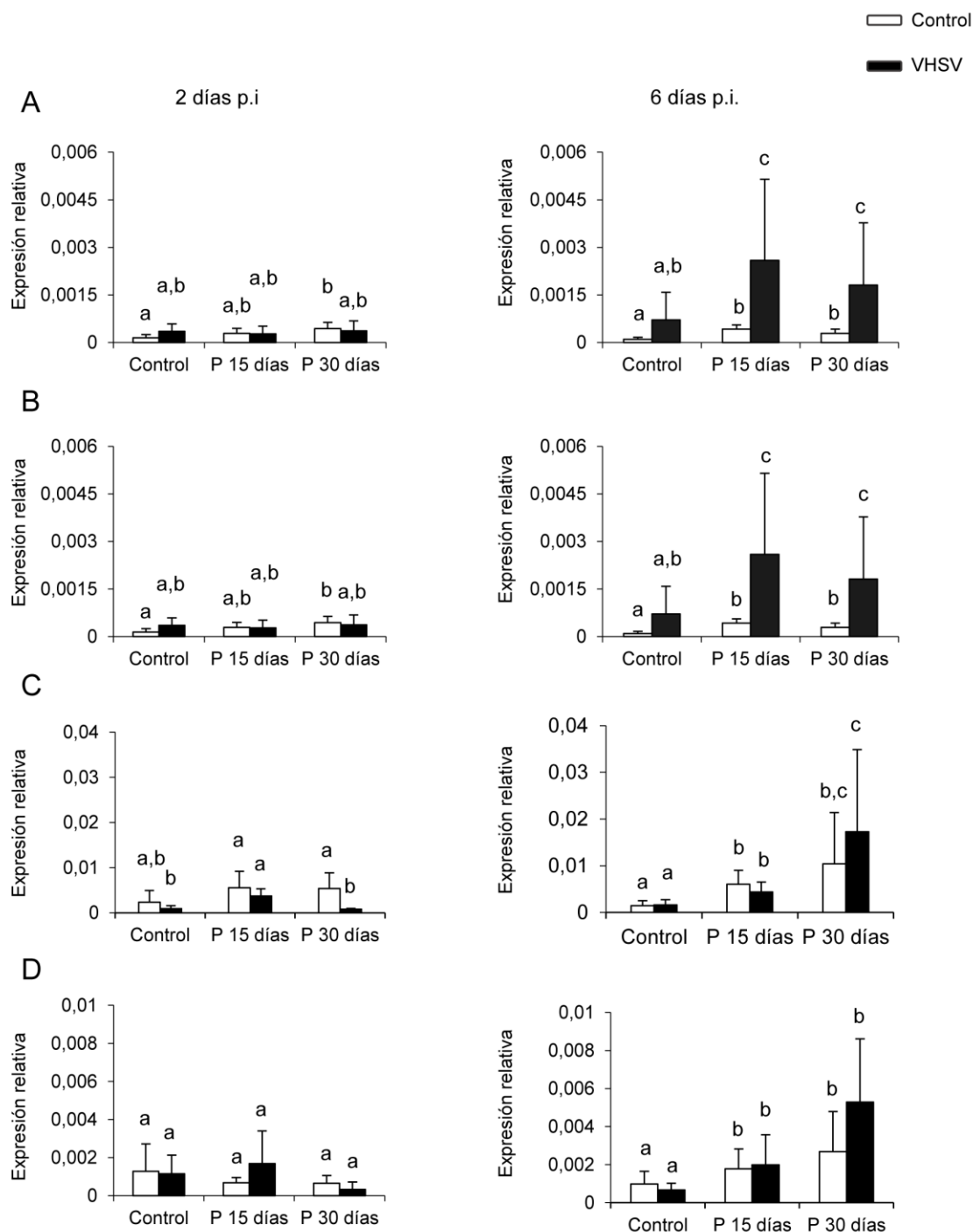
### 5.2.3. Efecto de la dieta en la expresión de IgT en riñón, intestino, branquia y piel

En ausencia de infección, cuando los peces se muestrearon a día 2, los niveles de ARN de IgT en riñón e intestino fueron más elevados en los peces alimentados con la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días (Fig. 18). A día 6, los peces que comieron Protec<sup>TM</sup> durante 15 o 30 días mostraron niveles de transcripción más elevados de IgT en todos los tejidos muestreados (Fig. 18).

Tras 6 días de infección, sólo aquellos individuos a los que se les suministró Protec<sup>TM</sup> (bien durante 15 o 30 días) fueron capaces de aumentar de forma significativa, sus niveles de transcripción de IgT en respuesta a VHSV en riñón e intestino (Fig. 18).



**Figura 17. Niveles de transcripción de IgM en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec™.** Se tomaron muestras de riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de IgM a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).



**Figura 18. Niveles de transcripción de IgT en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec™.** Se tomaron muestras de riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de IgT a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).

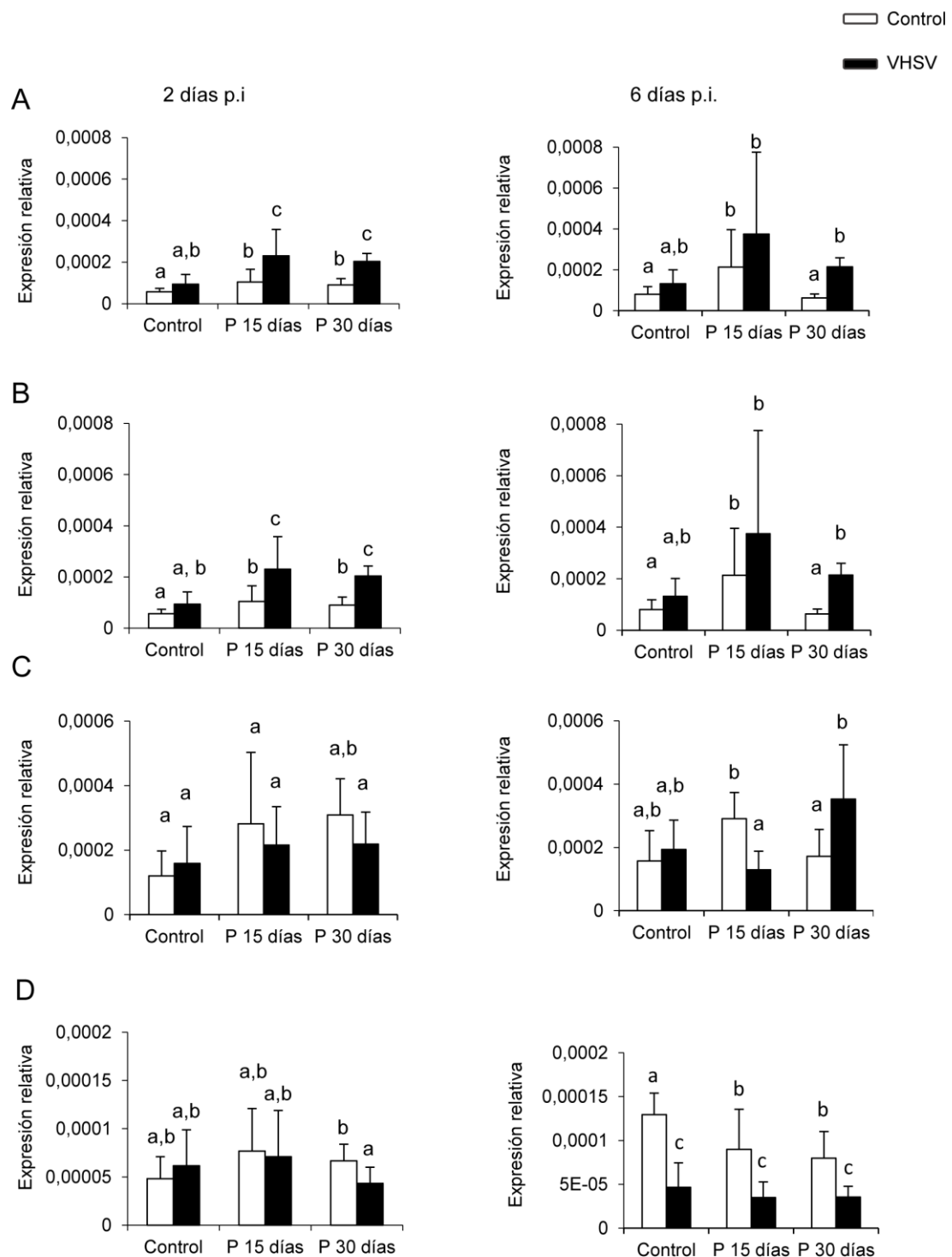
#### 5.2.4. Niveles de transcripción de IgD en riñón, intestino, branquia y piel

Cuando analizamos los niveles de ARN de IgD en los peces no infectados, observamos una mayor transcripción en los peces alimentados con Protec<sup>TM</sup> (durante 15 o 30 días) en riñón e intestino, en comparación con los niveles hallados en los peces que comieron la dieta control (Fig. 19). Cuando los peces se muestrearon a día 6, únicamente aquellos a los que se les suministró Protec<sup>TM</sup> durante 15 días mostraron niveles de transcripción de IgD mayores en estos tejidos (Fig. 19). Los peces alimentados con Protec<sup>TM</sup> presentaban menores niveles de ARN de IgD en la piel que los obtenidos en peces sustentados con la dieta control (Fig. 19).

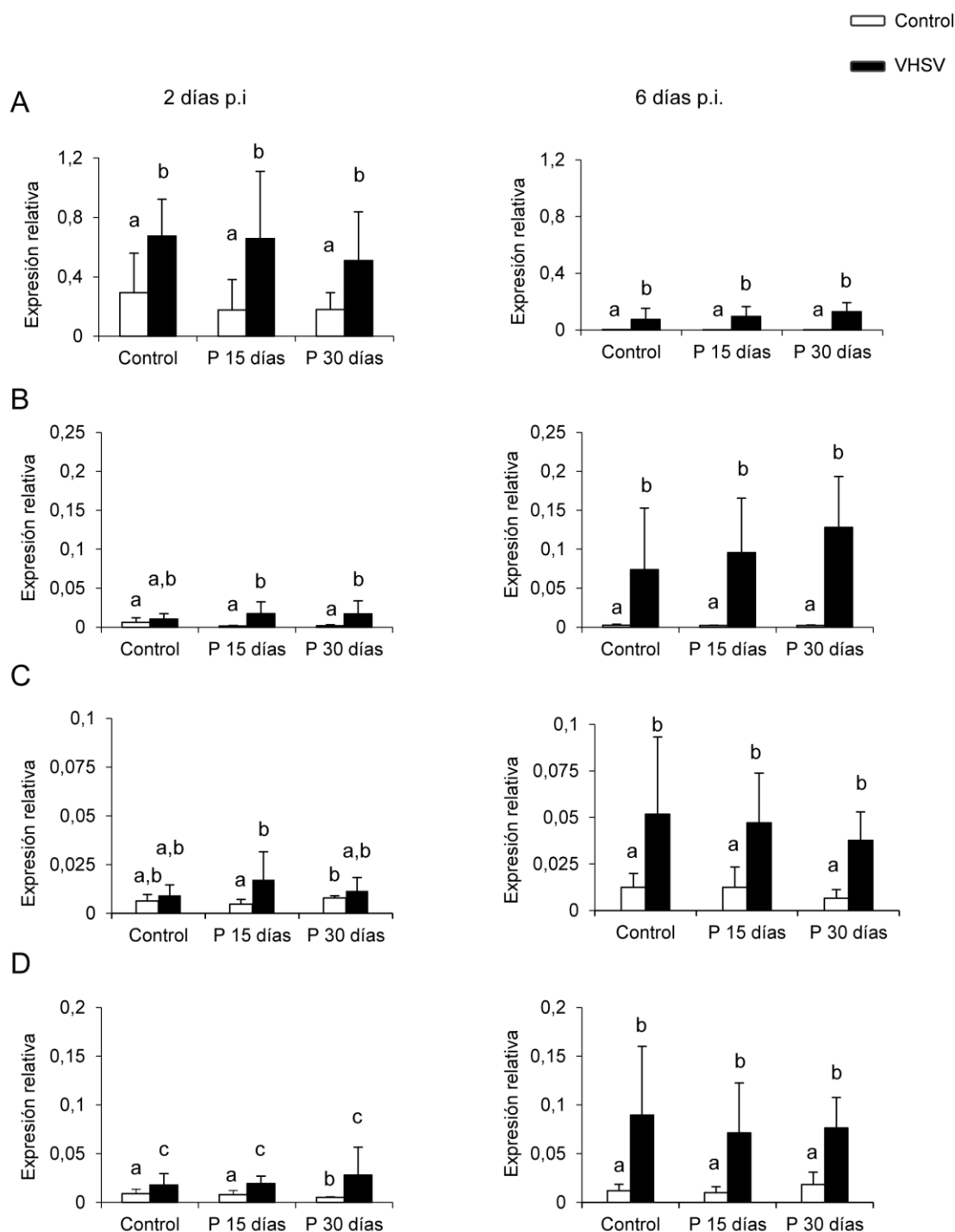
Después de 2 días de realizarse la infección, sólo los peces que comieron la dieta Protec<sup>TM</sup> (durante 15 o 30 días) lograron aumentar los niveles de ARN de IgD en respuesta a VHSV en riñón e intestino (Fig. 19). Después de 6 días de realizar la infección, únicamente los peces sustentados con Protec<sup>TM</sup> durante 15 días fueron capaces de reaccionar de forma significativa frente al virus, obteniéndose incrementos de los niveles de IgD en riñón, intestino y branquia (Fig. 19).

#### 5.2.5. Niveles de transcripción de Mx en riñón, intestino, branquia y piel

En el caso de Mx, no se encontraron diferencias notables entre los niveles de expresión de este gen en los distintos grupos en ausencia de infección (Fig. 20). Sin embargo, cuando los peces se infectaron, la transcripción de Mx aumentó de forma significativa en todos los tejidos, tanto a día 2 como día 6 después de realizarse la infección, sin que se encontraran diferencias significativas entre grupos en respuesta a la dieta (Fig. 20).



**Figura 19. Niveles de transcripción de IgD en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec™.** Se tomaron muestras de riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de IgD a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).



**Figura 20. Niveles de transcripción de Mx en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec™.** Se tomaron muestras de riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de Mx a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).

#### 5.2.6. Niveles de transcripción de IFN1 en riñón, intestino, branquia y piel

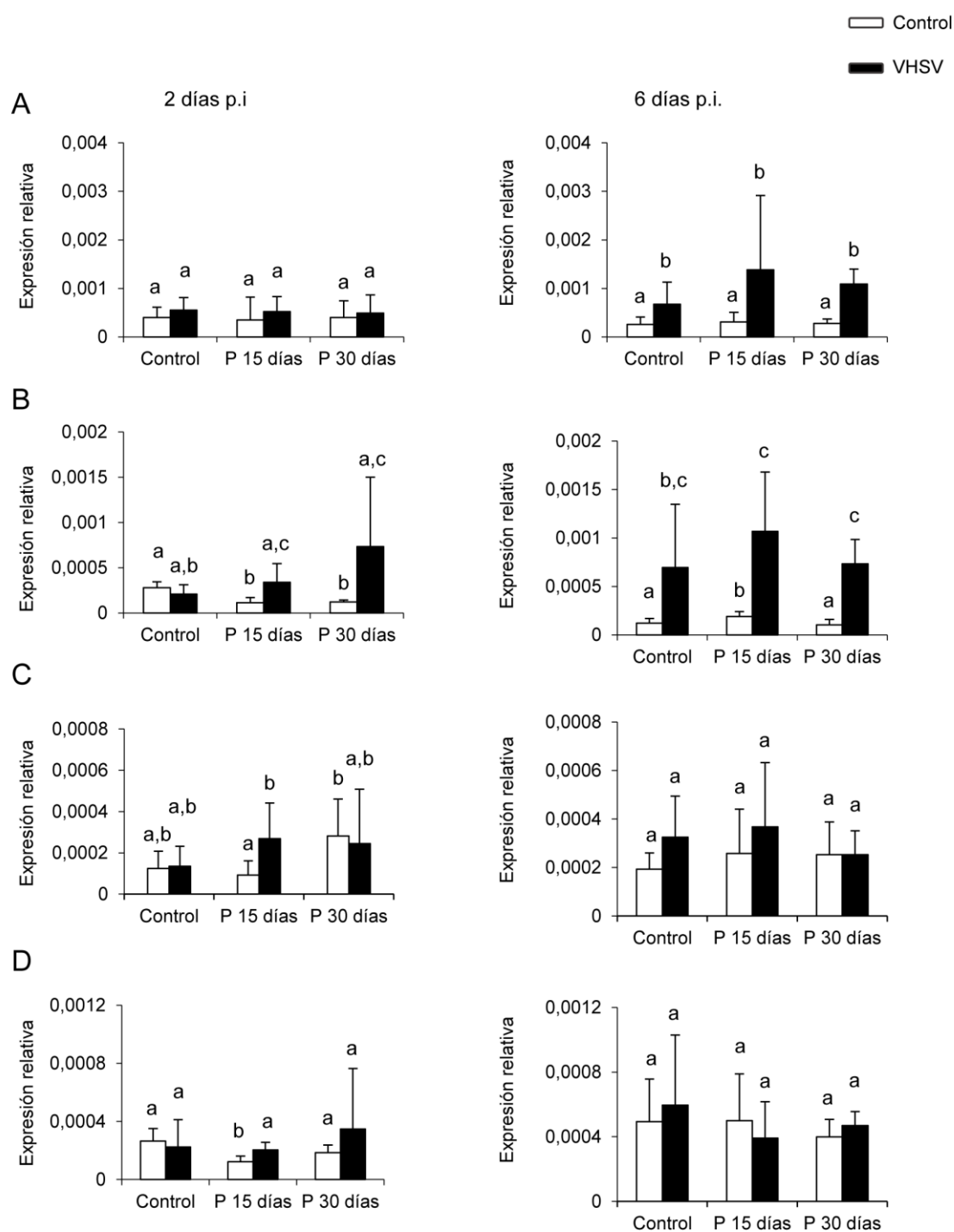
En ausencia de infección, los niveles de transcripción de IFN1 fueron mayores en las branquias de los peces alimentados con dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días, respecto a los hallados en los peces sustentados con la dieta control (Fig. 21). Sin embargo, en el caso de la piel, los peces alimentados con dieta Protec<sup>TM</sup> durante 15 días mostraron niveles de ARN de IFN1 menores que los observados en los peces que ingirieron la dieta control (Fig. 21). No obstante, cuando estos mismos animales se muestrearon a día 6, los niveles de ARN de IFN1 fueron mayores en intestino (Fig. 21).

Tras la infección, todos los grupos aumentaron los niveles de transcripción de IFN1 en respuesta a VHSV en el intestino a día 6, mientras que a día 2 únicamente los peces que habían sido alimentados con dieta Protec<sup>TM</sup> respondieron de forma significativa al virus (Fig. 21). El virus también aumentó los niveles de ARN de IFN1 en riñón tras 6 días de la infección, pero en este caso no se encontraron diferencias entre grupos (Fig. 21).

#### 5.2.7. Niveles de transcripción de IFN- $\gamma$ en riñón, intestino, branquia y piel

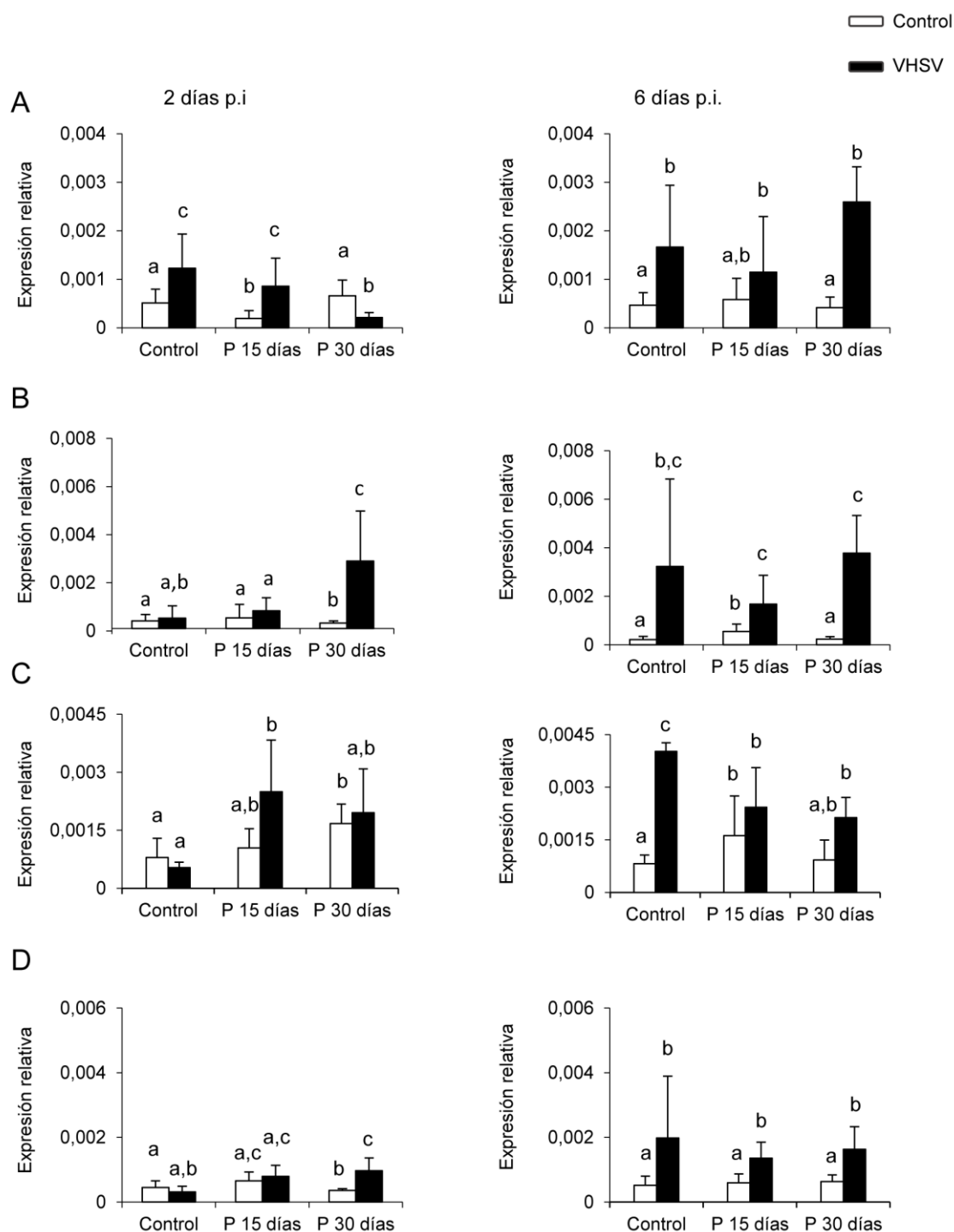
En ausencia de infección, los peces alimentados con la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 15 días mostraron niveles de transcripción de IFN- $\gamma$ , menores a los observados en peces sustentados con la dieta control en riñón, en cambio, estos peces mostraban niveles mayores en intestino y branquia (Fig. 22). Los peces que comieron la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días mostraron niveles mayores de ARN de IFN- $\gamma$  en las branquias en comparación con los observados en peces alimentados con la dieta control (Fig. 22).

Tras 2 días de infección, sólo los peces alimentados con Protec<sup>TM</sup> durante 30 días aumentaron de forma significativa los niveles de transcripción de IFN- $\gamma$  en intestino y piel (Fig. 22). El mismo tratamiento redujo dichos niveles en riñón en respuesta a VHSV, mientras que en los otros grupos el virus provocó un incremento en la transcripción de IFN- $\gamma$  (Fig. 22). Tras 6 días de la infección, todos los tratamientos respondieron de forma significativa a VHSV en riñón, intestino y piel sin encontrarse diferencias entre grupos (Fig. 22), mientras que en el caso de la branquia, únicamente los peces alimentados con la dieta control fueron capaces de responder de forma significativa al virus (Fig. 22).



**Figura 21. Niveles de transcripción de IFN1 en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec™.** Se tomaron muestras de riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de IFN1 a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).





**Figura 22. Niveles de transcripción de IFN- $\gamma$  en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.** Se tomaron muestras de riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de IFN- $\gamma$  a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).

#### 5.2.8. Niveles de transcripción de IL-8 en riñón, intestino, branquia y piel

Dado que algunos de los extractos vegetales incluidos en la dieta Protec<sup>TM</sup> parecían ejercer efectos pro-inflamatorios, quisimos estudiar la modulación de la expresión de IL-8 en peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>, ya que la IL-8 es una citoquina pro-inflamatoria.

Los peces no infectados a los que se les suministro Protec<sup>TM</sup> presentaron mayores niveles de transcripción de IL-8 en branquia tras 2 días de la infección, mientras que a día 6 sólo los individuos alimentados durante 15 días con Protec<sup>TM</sup> presentaron mayores niveles del ARN de IL-8 en riñón, intestino y branquia (Fig. 23).

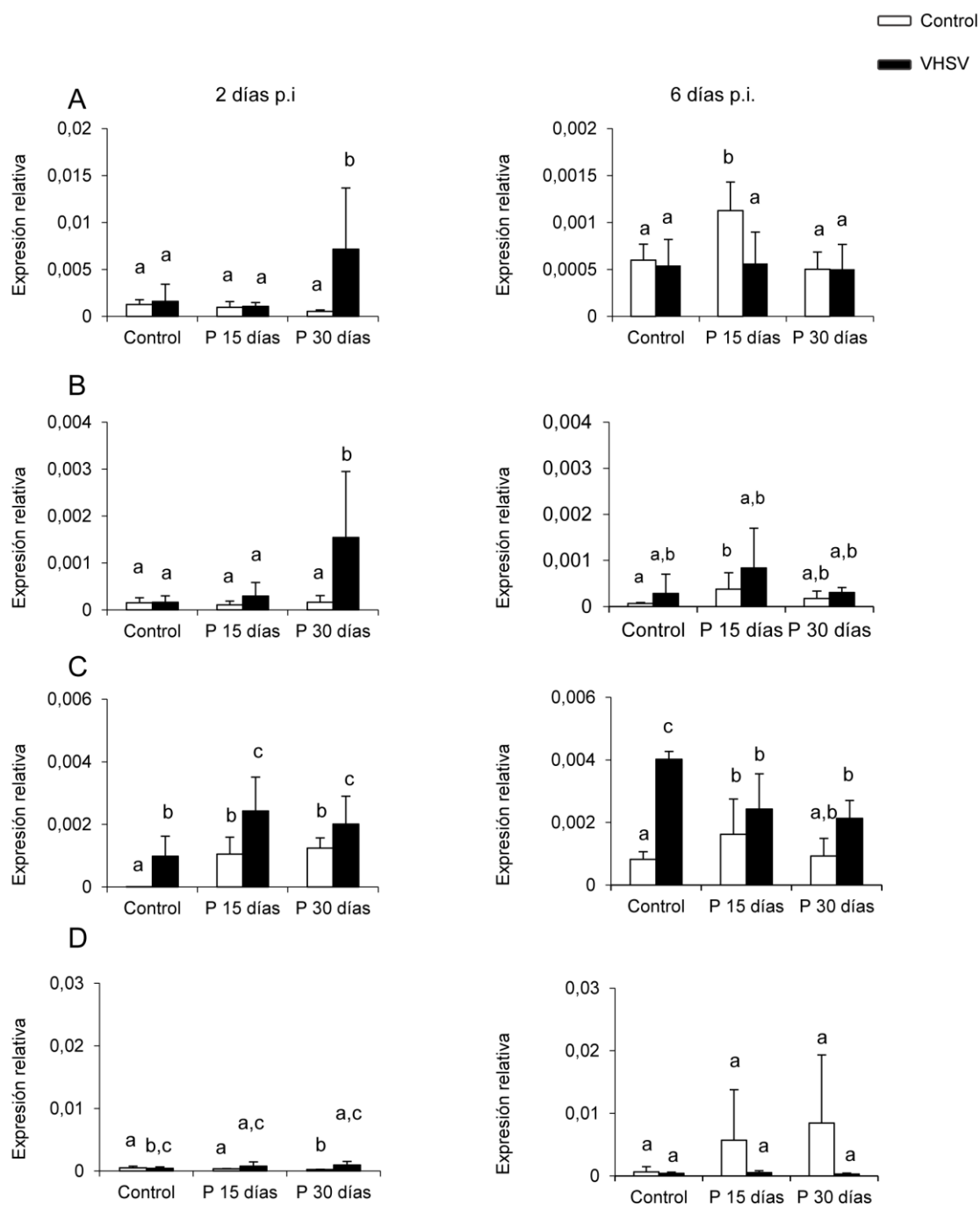
Tras 2 días de infección con VHSV, sólo los animales sustentados con Protec<sup>TM</sup> durante 30 días fueron capaces de incrementar los niveles de IL-8 en riñón e intestino (Fig. 23), mientras que todos los grupos respondieron de forma significativa al virus en branquia (Fig. 23). En este órgano, tras 6 días de infección, únicamente los peces alimentados con la dieta control respondieron a VHSV (Fig. 23).

#### 5.2.9. Niveles de transcripción de perforina en riñón, intestino, branquia y piel.

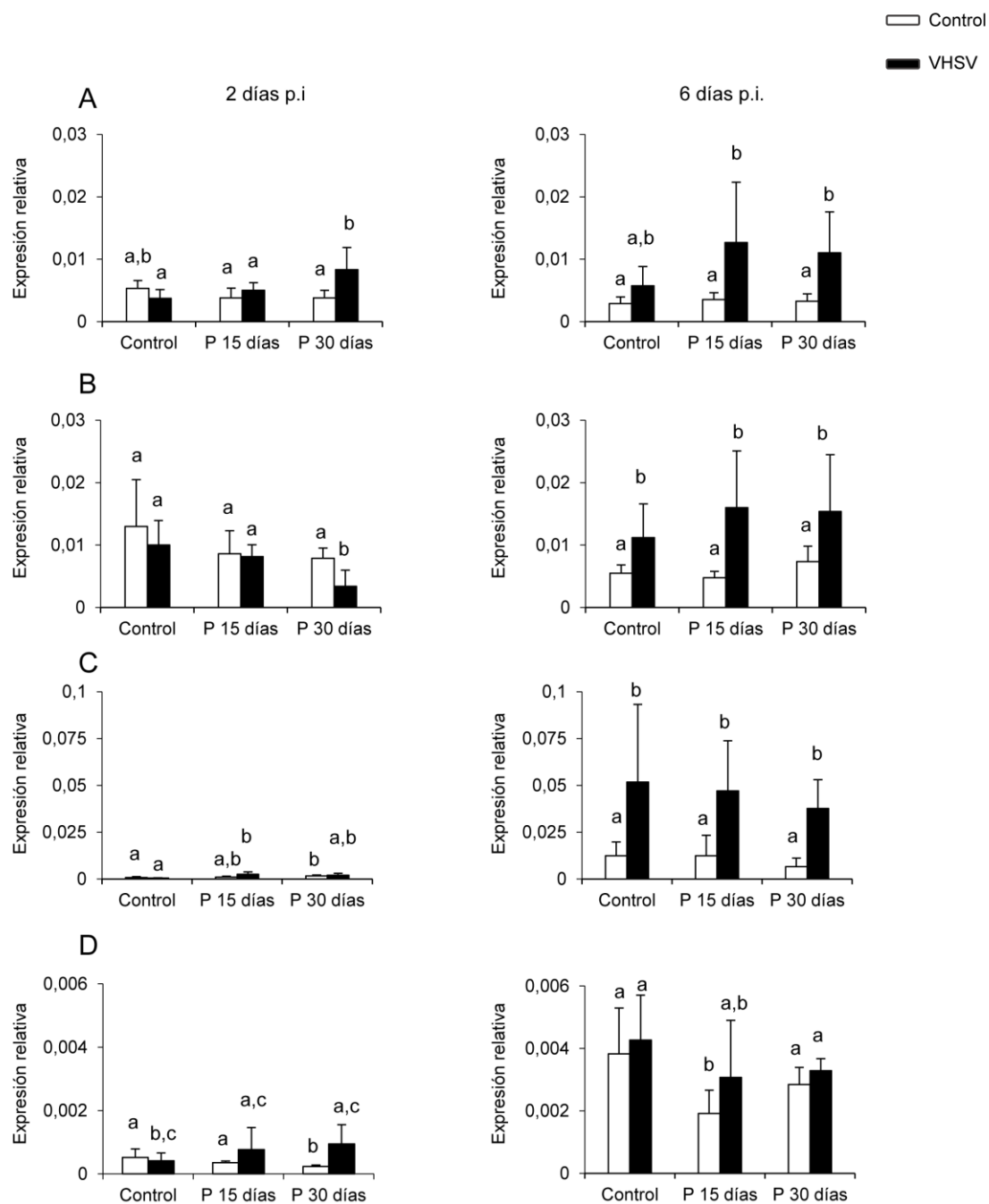
Como consecuencia del aumento obtenido en los niveles de transcripción de IFN- $\gamma$ , en varios órganos de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>, y dado que existe una relación entre los niveles de IFN- $\gamma$  y los de perforina (Tafalla et al., 2016), quisimos estudiar también la transcripción de este gen en nuestro experimento.

En peces no infectados no detectamos ningún efecto relevante de la dieta Protec<sup>TM</sup> sobre la transcripción de perforina en ninguno de los tejidos analizados (Fig.24).

En los animales expuestos a VHSV, observamos que a 2 días la respuesta de los peces alimentados con la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días al virus fue distinta en riñón, intestino y piel que en el resto de grupos, observándose aumentos en riñón y piel y reducciones en intestino (Fig. 24). Tras 6 días de infección, se obtuvo un aumento de los niveles de perforina en todos los grupos experimentales en intestino y branquia, mientras que en el riñón sólo los animales que habían recibido la dieta Protec<sup>TM</sup> aumentaron los niveles de ARN de perforina en respuesta al virus (Fig. 24).



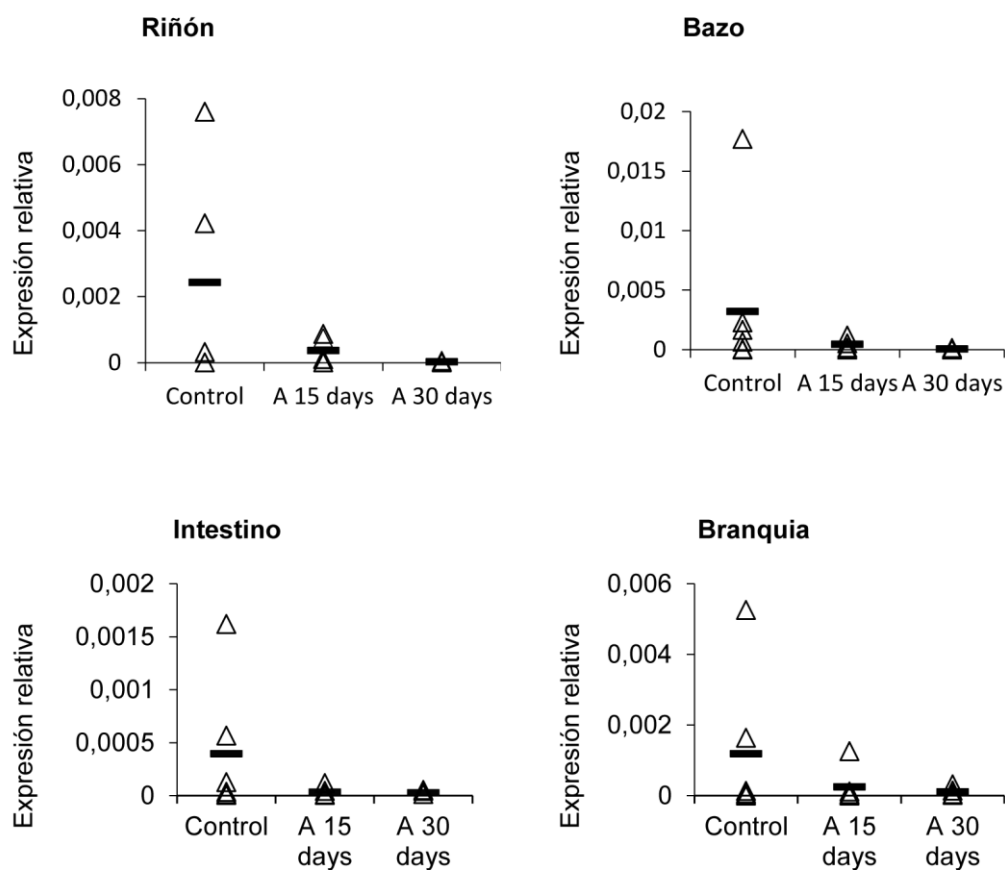
**Figura 23. Niveles de transcripción de IL-8 en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec™.** Se muestrearon riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de IL-8 a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).



**Figura 24. Niveles de transcripción de perforina en el riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec™.** Se muestrearon riñón (A), intestino (B), branquia (C) y piel (D) para extraer su ARN y cuantificar el nivel de transcripción de perforina a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa de genes normalizados frente a la transcripción del gen constitutivo EF-1 $\alpha$  (media + desviación estándar). Las letras representan las diferencias entre grupos, siendo “a” el grupo de peces alimentados con la dieta control en ausencia de infección, añadiéndose letras sucesivas en el alfabeto cuando se encuentran diferencias significativas utilizando la prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral ( $p < 0.05$ ).

#### 5.2.10. Efecto de Protec<sup>TM</sup> en la carga viral tras la infección con VHSV

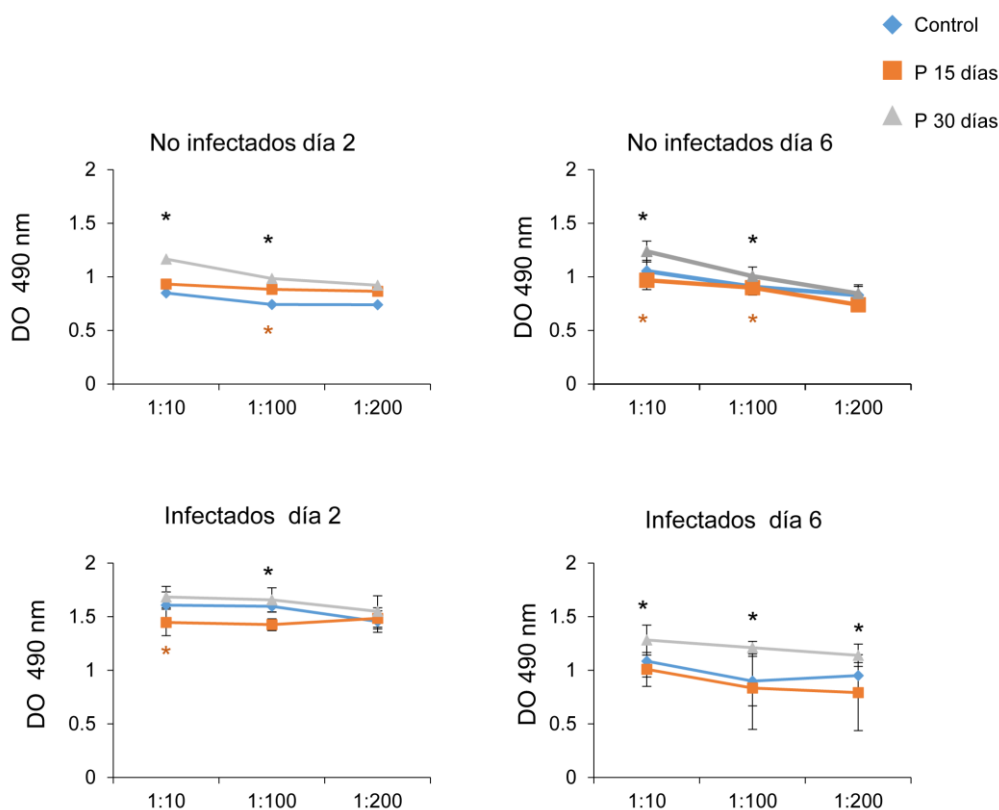
Por último, en el caso de los peces infectados, determinamos la carga viral en riñón, bazo, intestino y branquia evaluando los niveles de transcripción del gen que codifica para la glicoproteína G de VHSV. Tal como se muestra en la Figura 25, la carga viral fue menor en los peces alimentados con la dieta Protec<sup>TM</sup>, siendo más acusada la diferencia en los que ingirieron la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días que aquellos a los que se les administró Protec<sup>TM</sup> únicamente 15 días. A pesar de esto, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos debido a la dispersión de los datos.



**Figura 25. Niveles de transcripción de la proteína G de VHSV en el riñón, bazo, intestino y branquia de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.** Después de 6 días de realizar la infección, se muestrearon el riñón, el bazo, el intestino y la branquia de los peces infectados para extraer su ARN y analizar los niveles de transcripción de la proteína G del VHSV a través de PCR en tiempo real. Las gráficas muestran la expresión relativa normalizada frente a la transcripción del gen de referencia EF-1 $\alpha$  en animales individuales (triángulos) así como el valor de la media en cada grupo (barras).

### 5.2.11 Efecto de Protec<sup>TM</sup> en los niveles de anticuerpos naturales de suero

Dado que observamos una modulación de los niveles de transcripción de IgM en distintos órganos en los peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>, quisimos determinar el título de IgM presentes en el suero de los animales estudiados. Estos sueros se recogieron a tiempos muy cortos tras la infección, por lo que no es previsible que en esos momentos hubiera anticuerpos específicos frente a VHSV. Por tanto, estudiamos únicamente los niveles de IgM total, considerando que todas las IgMs presentes en estos momentos eran anticuerpos naturales. La Figura 26 muestra como en ausencia de infección, el título de IgM fue mayor en los peces alimentados con la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días, alcanzando diferencias significativas con el grupo control. Aunque los peces que ingirieron Protec<sup>TM</sup> durante 15 días también mostraron niveles algo más elevados que los peces control, las diferencias no fueron significativas (Fig. 26). Tras la infección, sólo los peces a los que se les suministró la dieta Protec<sup>TM</sup> durante 30 días mostraron niveles de IgM en el suero significativamente mayores que los obtenidos en peces alimentados con la dieta control (Fig. 26).



**Figura 26. Título de IgM en el suero de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.** Se extrajo suero de todos los peces muestreados y se determinó el título de IgM mediante ELISA. Las gráficas muestran los valores medios de densidad óptica (DO) a 490 nm  $\pm$  desviación estándar. Se aplicó una prueba *t* de Student para poblaciones con diferente tamaño muestral, \* denota diferencias significativas con los valores obtenidos en el grupo de peces alimentados con la dieta control ( $p < 0.05$ ).

### 5.3. Discusión

Pese a que estudios previos llevados a cabo por la empresa productora de la dieta Protec<sup>TM</sup> suplementada con immunoestimulantes, parecían indicar una mejora de algunos parámetros inmunológicos en los peces, no se conocían hasta el momento los efectos de dicha dieta a nivel molecular en los distintos órganos. Por otro lado, tampoco se había determinado de forma empírica cual era el mejor tiempo de administración para lograr una respuesta óptima. Por dicho motivo, en este Capítulo, comparamos los efectos de la dieta Protec<sup>TM</sup>, administrada durante 15 o 30 días, en los niveles de transcripción de distintos genes inmunológicos en riñón, intestino, branquia y piel.

A la hora de elaborar una dieta, es importante verificar que ésta no perjudique el crecimiento de los peces. Por lo tanto, lo primero que comprobamos en nuestro trabajo fue que la dieta Protec<sup>TM</sup> no producía efectos negativos en el desarrollo de los peces, en base a la ausencia de cambios reseñables en el factor de condición.

Respecto a la regulación de Igs, en ausencia de infección, fueron los peces alimentados durante 15 días con la dieta Protec<sup>TM</sup> los que mostraron unos niveles de transcripción de IgM, IgD e IgT mayores, lo que parecía indicar que la respuesta inmunitaria tras 15 días era mejor que la observada tras 30 días de administración. Sin embargo, cuando estos peces se infectaron por baño con VHSV, sólo a los que se les suministró Protec<sup>TM</sup> durante 30 días fueron capaces de aumentar significativamente los niveles de IgM, IgT e IgD en respuesta a VHSV. De forma similar, los niveles de anticuerpos naturales en suero también fueron mayores en los peces alimentados con Protec<sup>TM</sup> durante 30 días, por lo que independientemente de los niveles de ARN basales, parece que son los peces alimentados durante 30 días los que están mejor preparados para responder a la infección viral.

Si bien se ha demostrado la existencia de IgMs específicas en todas las especies de teleósteos estudiadas hasta la actualidad (Kaattari, 1992; Lobb et al., 1984; Rombout et al., 1993), el papel de éstas en la protección contra virus no es tan evidente, ya que a pesar de haberse obtenido protección por medio de inmunización pasiva con sueros o con IgM purificada de truchas supervivientes a infecciones (Lorenzen y LaPatra, 1999; Olesen, 1986), las IgMs específicas antivirales no se detectan en suero hasta 6-10 semanas después de la infección (Olesen et al., 1991; Olesen y Vestergaard-Jorgensen, 1986), mucho después de cesar la mortalidad (generalmente 1 semana después de la infección).

Por consiguiente, los anticuerpos neutralizantes específicos producidos como respuesta a una infección en peces, aparecen demasiado tarde para generar protección en aquellos que resisten de forma natural a la infección. Sin embargo, los anticuerpos naturales, IgMs no específicas de baja afinidad, que interfieren con la replicación de los agentes patógenos en los primeros momentos de infección, sí que pueden jugar en estas etapas tempranas un papel importante tal como se ha descrito anteriormente (Boes, 2000). Ahora bien, desconocemos por el momento hasta qué punto el aumento de IgT e IgD que se observa en los peces tratados con Protec<sup>TM</sup> puede afectar a la resistencia al virus. IgT se ha descrito como una Ig específica de mucosas (Salinas, 2015; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2010), aunque también parece jugar algún papel en la respuesta sistémica (Aquilino et al., 2014; Castro et al., 2014a; Castro et al., 2013a; Castro et al., 2013b; Pignatelli et al., 2014). Por otro lado, se desconoce en la actualidad el papel de IgD en las infecciones tanto en peces como en mamíferos (Chen y Cerutti, 2011).

Por lo que respecta a los genes antivirales estudiados, Mx, IFN1 e IFN- $\gamma$ , la administración de Protec<sup>TM</sup> no parece tener unos efectos muy notables en su regulación ni en condiciones basales ni frente a la infección, donde hemos encontrado que estos genes se inducían de forma significativa en respuesta al virus en todos los tejidos sin que se encontraran diferencias significativas entre grupos en la mayoría de los casos.

En algunos órganos y situaciones particulares pudimos observar un efecto positivo de Protec<sup>TM</sup> en los niveles de transcripción de IFN- $\gamma$ , como el aumento inducido por Protec<sup>TM</sup> administrado durante 30 días, tras 6 días de infección por VHSV. El IFN- $\gamma$  es una citoquina que favorece respuestas de tipo Th1, dirigidas fundamentalmente contra patógenos intracelulares tales como virus o bacterias intracelulares, a través de la activación de linfocitos Tc y macrófagos (Boehm et al., 1997). Actúa en macrófagos activando la expresión de MHC I y MHC II (Martin et al., 2007; Zou et al., 2005), la producción de NO, el estallido respiratorio y la capacidad fagocítica (Grayfer y Belosevic, 2009; Zou et al., 2005), además de haberse descrito sus efectos antivirales en peces (Lopez-Munoz et al., 2010).

En base a esta regulación, dado que el IFN- $\gamma$  parece correlacionarse con los niveles de perforina, (Tafalla et al., 2016) quisimos también determinar cómo afectaba Protec<sup>TM</sup> a los niveles de transcripción de esta molécula, ya que es efectora de células Tc (Milstein et al., 2011) e interviene en la muerte de células infectadas por virus y células cancerosas (Strasser et al., 2009).

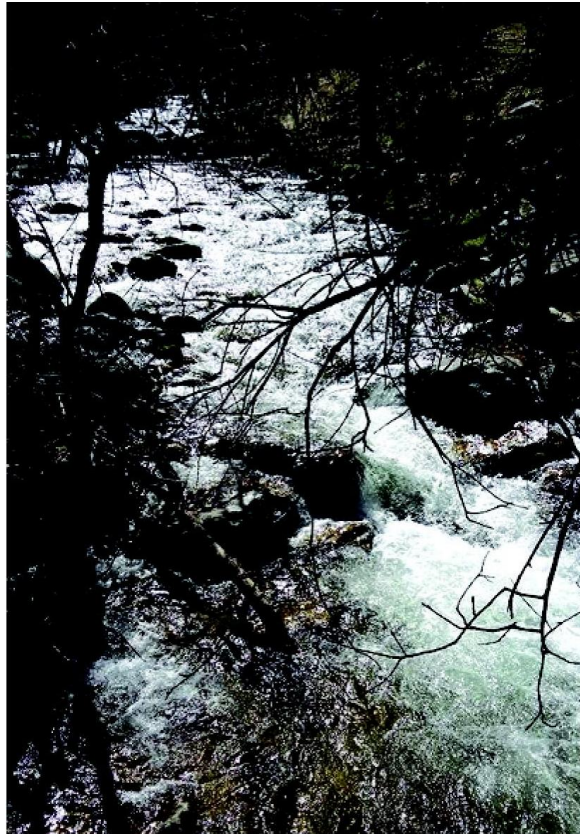


Mediante dichos análisis pudimos comprobar que la inducción de la transcripción de perforina en respuesta a VHSV era mayor en los peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>, especialmente en riñón, branquia y piel. Dado el efecto de la perforina en la lisis de células infectadas con virus, parece razonable pensar que una mayor inducción de perforina conllevaría un aumento de la actividad citotóxica frente al virus lo que sería beneficioso para el control de la infección.

Por otro lado, los peces sustentados con Protec<sup>TM</sup> también mostraban una respuesta inflamatoria mayor ante la infección viral en intestino, riñón y piel estimada por medio de los niveles de transcripción de IL-8. Una mayor inflamación en los momentos iniciales de infección, desencadenarán una mayor respuesta inmunitaria lo que seguramente conllevará un mejor control de la replicación viral (Reyes-Cerpa et al., 2014; Reyes-Cerpa et al., 2012).

El hecho de que la alimentación Protec<sup>TM</sup> provoque una mayor respuesta inflamatoria, una mejor respuesta de perforina y una mayor producción de anticuerpos naturales, parece prever un mejor control de la infección viral en estos peces, lo cual quisimos comprobar analizando la replicación de un gen viral en los distintos tejidos. Los niveles de transcripción de la proteína G de VHSV fueron menores en riñón, bazo, intestino y branquia de los peces alimentados con Protec<sup>TM</sup> durante 30 días. Después de 15 días de suministrar Protec<sup>TM</sup>, aunque la carga viral también fue más baja respecto a la observada en peces sustentados con la dieta control, las diferencias fueron menores, lo que apoya el hecho de que los peces se encuentran en un estado inmunológico mejor tras 30 días de alimentación. Dichos resultados confirman el efecto beneficioso de Protec<sup>TM</sup> en el control de las enfermedades virales, tal como se había corroborado por parte de la empresa Skretting para otros virus como SAV o nodavirus (Nexus Skretting n°18 spring 2013).





### **Capítulo III**

## **Efecto de la vitamina C en la respuesta inmunitaria innata de trucha arcoíris**



## 6.1. Introducción

En mamíferos, la vitamina C regula diversas funciones celulares incluyendo algunas funciones inmunitarias. En ratones se ha descrito que el suplemento de la dieta con vitamina C desencadena una respuesta de tipo Th1 (Jeong et al., 2011). En humanos, la inclusión en la dieta de suplementos de vitamina C incrementa los títulos de anticuerpos naturales (Prinz et al., 1977) y estimula la producción de radicales libres de oxígeno (estallido respiratorio) de neutrófilos así como su capacidad fagocítica (Bozonet et al., 2015; Sharma et al., 2004). A pesar de estas observaciones, los mecanismos mediante los cuales la vitamina C ejerce efectos en las respuestas inmunitarias no se han detallado.

En peces, se ha demostrado que el suplemento de la dieta con vitamina C activa diversas funciones inmunitarias como el estallido respiratorio (Kumari y Sahoo, 2005; Ortuno et al., 2001; Tewary y Patra, 2008), la fagocitosis (Tewary y Patra, 2008), la actividad de la lisozima (Dawood et al., 2016; Ren et al., 2007) y la producción de factores del complemento (Kumari y Sahoo, 2005; Xu et al., 2016a) en múltiples especies. Asimismo se han hallado efectos positivos de la vitamina C en las propiedades antimicrobianas del mucus de la piel (Ren et al., 2007; Roosta et al., 2014), así como en la microbiota intestinal (Liu et al., 2011).

En concordancia con estos estudios en los que se describen efectos positivos de la vitamina C sobre el sistema inmunitario, se ha descrito un aumento en la supervivencia de diversas especies frente a la exposición a patógenos, en peces alimentados con dietas suplementadas con vitamina C (Barros et al., 2014; Kumari y Sahoo, 2006; Tewary y Patra, 2008; Wahli et al., 1986); tanto en infecciones bacterianas (Barros et al., 2014; Kumari y Sahoo, 2006; Tewary y Patra, 2008), como parasitarias (Wahli et al., 1986). Sin embargo, tal como ocurre en mamíferos, se desconocen por el momento los mecanismos a través de los cuales la vitamina C ejerce sus efectos inmunomoduladores.

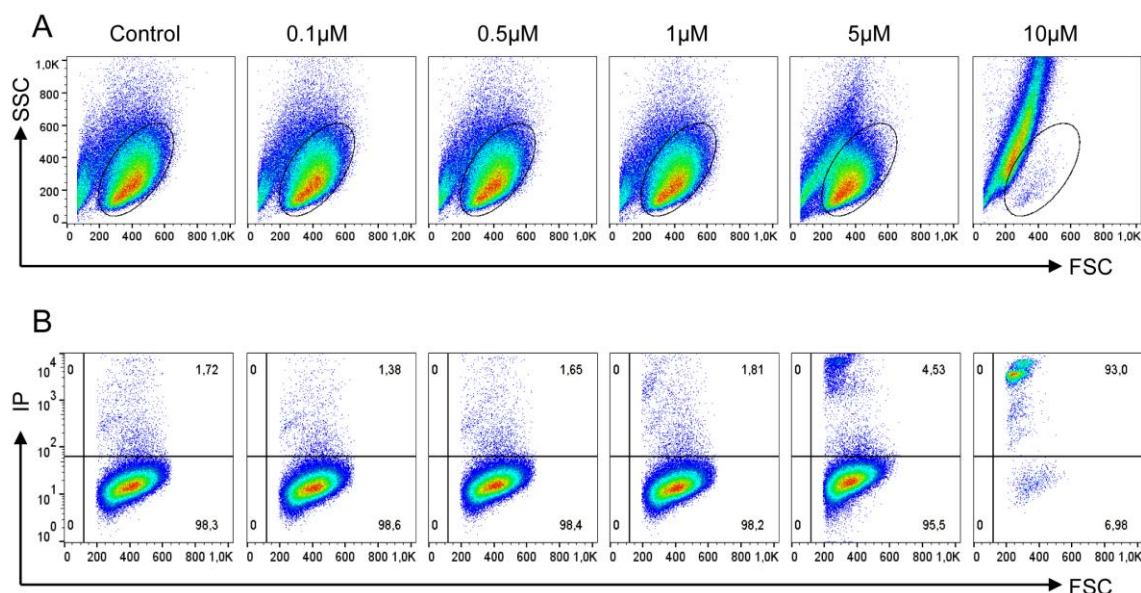
Los efectos de la vitamina C en el sistema inmunitario de la trucha arcoíris no se han abordado por el momento. Por lo tanto, en este Capítulo hemos estudiado los efectos de la vitamina C en diversas funciones inmunitarias de trucha arcoíris tales como el estallido respiratorio, la fagocitosis, la migración celular o la respuesta inflamatoria. Para ello, hemos utilizado dos poblaciones diferentes, una línea celular de monocitos-macrófagos de trucha, RTS11, y cultivos primarios de leucocitos de riñón, realizando ensayos *in vitro* con distintas dosis de vitamina C.

## 6.2. Resultados

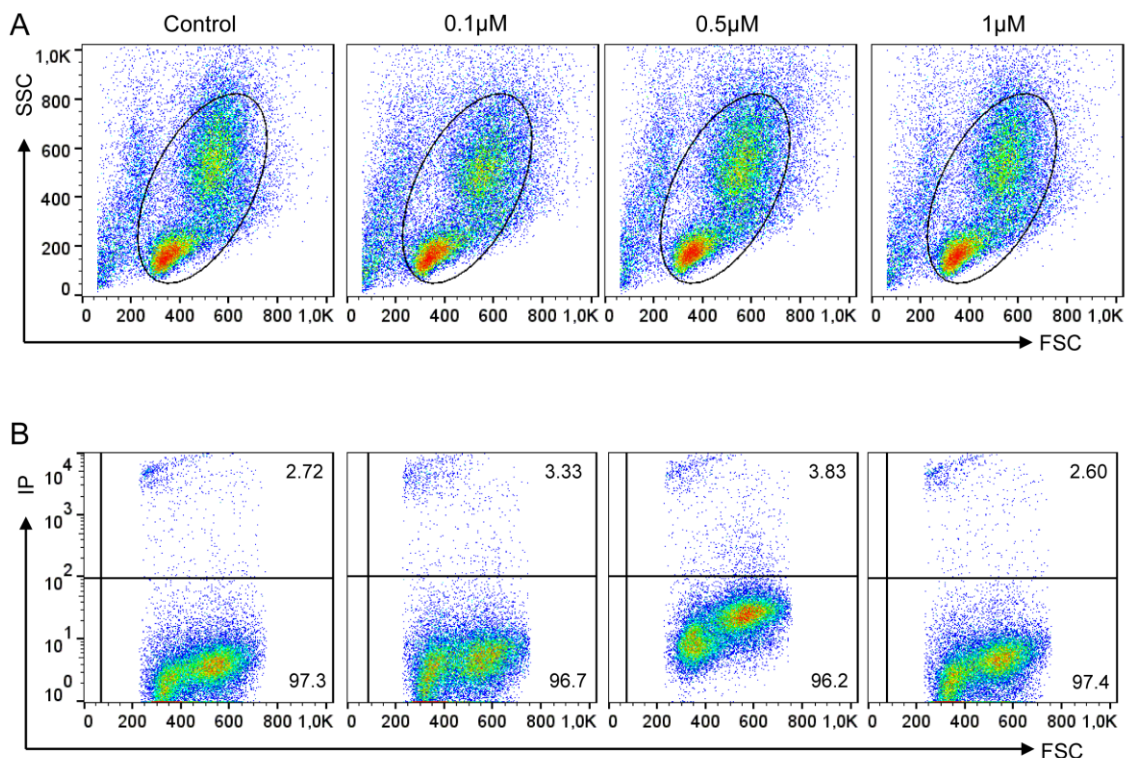
### 6.2.1. Evaluación de la citotoxicidad de la vitamina C

Antes de determinar los efectos de la vitamina C sobre las funciones inmunitarias de poblaciones leucocitarias de trucha, determinamos los posibles efectos citotóxicos que la vitamina C podría tener sobre la viabilidad de las células, tanto en la línea celular RTS11, como en leucocitos de riñón. Para ello, se incubaron las dos poblaciones celulares con distintas dosis de vitamina C (0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) durante 24, 48 y 72 horas y se determinó la viabilidad celular con ioduro de propidio (IP).

Como muestran las Figuras 27 y 28, los datos se analizaron mediante citometría de flujo. Así, pudimos observar que la dosis de 10  $\mu$ M provocó en ambas poblaciones una mortalidad cercana al 100%. Sin embargo dosis de 1  $\mu$ M o menores no provocaron disminuciones en la viabilidad celular, mientras que con una dosis de 5  $\mu$ M la supervivencia de ambas poblaciones disminuyó sensiblemente, reflejando un efecto deletéreo en células RTS11 y en leucocitos de riñón. Por este motivo, para los estudios posteriores se escogieron las dosis de 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, y 1  $\mu$ M de vitamina C.



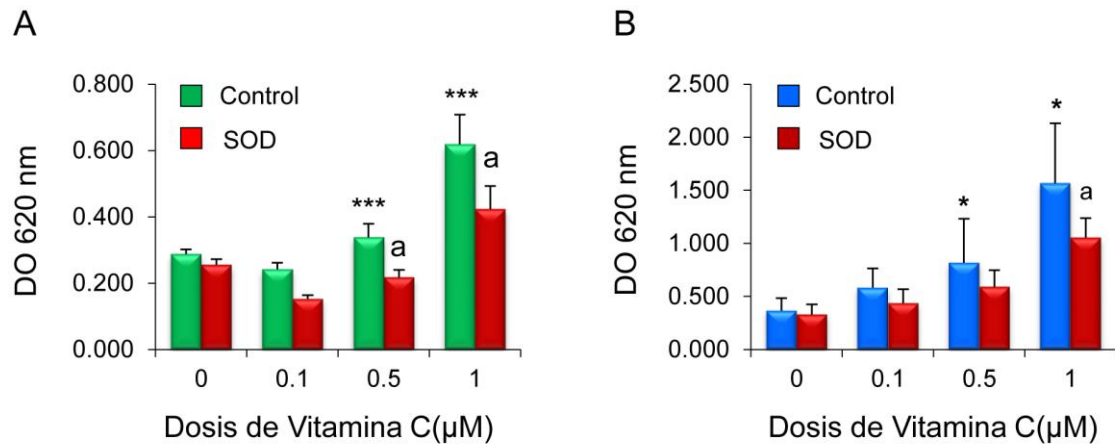
**Figura 27. Viabilidad celular de RTS11 con diferentes dosis de vitamina C.** Determinación por citometría de flujo de la supervivencia celular de la línea celular RTS11 con IP con diferentes dosis (0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) de Vitamina C.



**Figura 28. Viabilidad celular de leucocitos de riñón con diferentes dosis de vitamina C.** Determinación por citometría de flujo de la supervivencia celular de leucocitos de riñón con IP con diferentes dosis (0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM, 5 μM y 10 μM) de vitamina C.

#### 6.2.2. Efecto de la vitamina C en el estallido respiratorio de RTS11 y de leucocitos de riñón

Para determinar los efectos de la vitamina C en la producción de especies reactivas de oxígeno (estallido respiratorio) se utilizó la técnica de NBT (nitroazul de tetrazolio). Así, pudimos establecer que la vitamina C a concentraciones de 0.5 μM o 1 μM indujo la producción de radicales de oxígeno por sí sola en ambas poblaciones celulares (Fig. 29). La especificidad de la reacción se comprobó mediante la adición de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que bloquea específicamente dicha producción. Como control de una posible interferencia de la vitamina C en la reducción de NBT se mezclaron ambos reactivos en ausencia de células, lo cual no produjo ninguna reacción.



**Figura 29. Estallido respiratorio de células RTS11 y leucocitos de riñón en respuesta a vitamina C.** Las células RTS11 (A) y los leucocitos de riñón (B), se incubaron con NBT (1 mg/ml) con diferentes dosis de vitamina C (0, 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M). Para corroborar la especificidad de la reacción se añadió en algunos pocillos SOD (300 unidades/ml). Tras 30 minutos de incubación a 20°C, la reducción de NBT se midió a una densidad óptica de 620 nm. Los datos corresponden a la media (n=8 + desviación estándar). Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los valores obtenidos en células control (0) y células tratadas con las diferentes dosis de vitamina C (\*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.005$ ). Las “a” indican diferencias significativas en los niveles de reducción del NBT en las muestras tratadas con SOD y sus respectivos tratamientos.

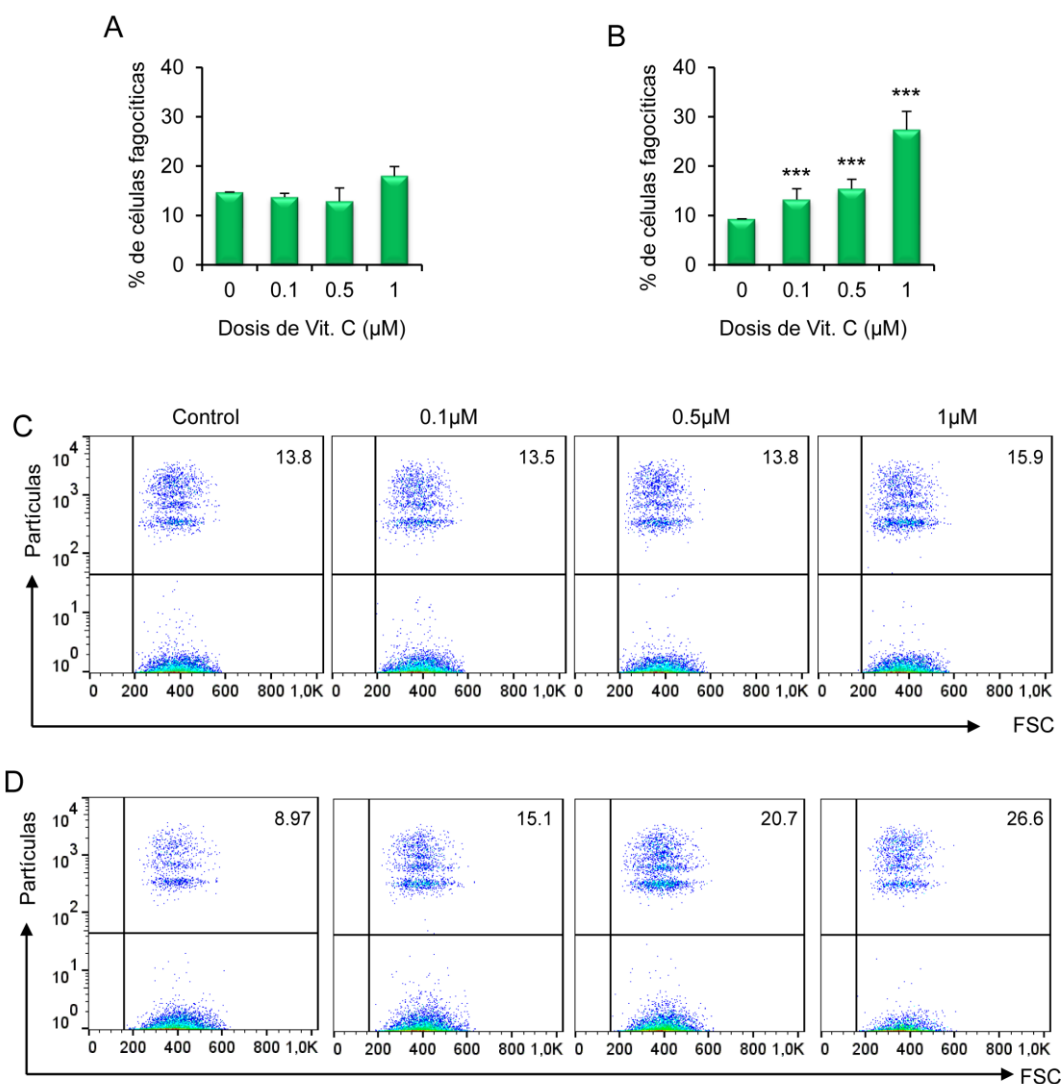
### 6.2.3. Efecto de la vitamina C en la capacidad fagocítica de RTS11 y leucocitos de riñón

Para estudiar el efecto de la vitamina C en la capacidad fagocítica de ambas poblaciones celulares, se utilizaron dos tipos de ensayos diferentes. En los primeros, denominados experimentos de co-incubación, la vitamina C se añadió al mismo tiempo que las esferas de poliestireno a fagocitar. En los otros experimentos, designados como ensayos de pre-incubación, las células se incubaron con la vitamina C durante 24 horas y tras ese tiempo se añadieron las esferas de poliestireno. Las dosis de vitamina C utilizadas fueron 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M en ambos ensayos.

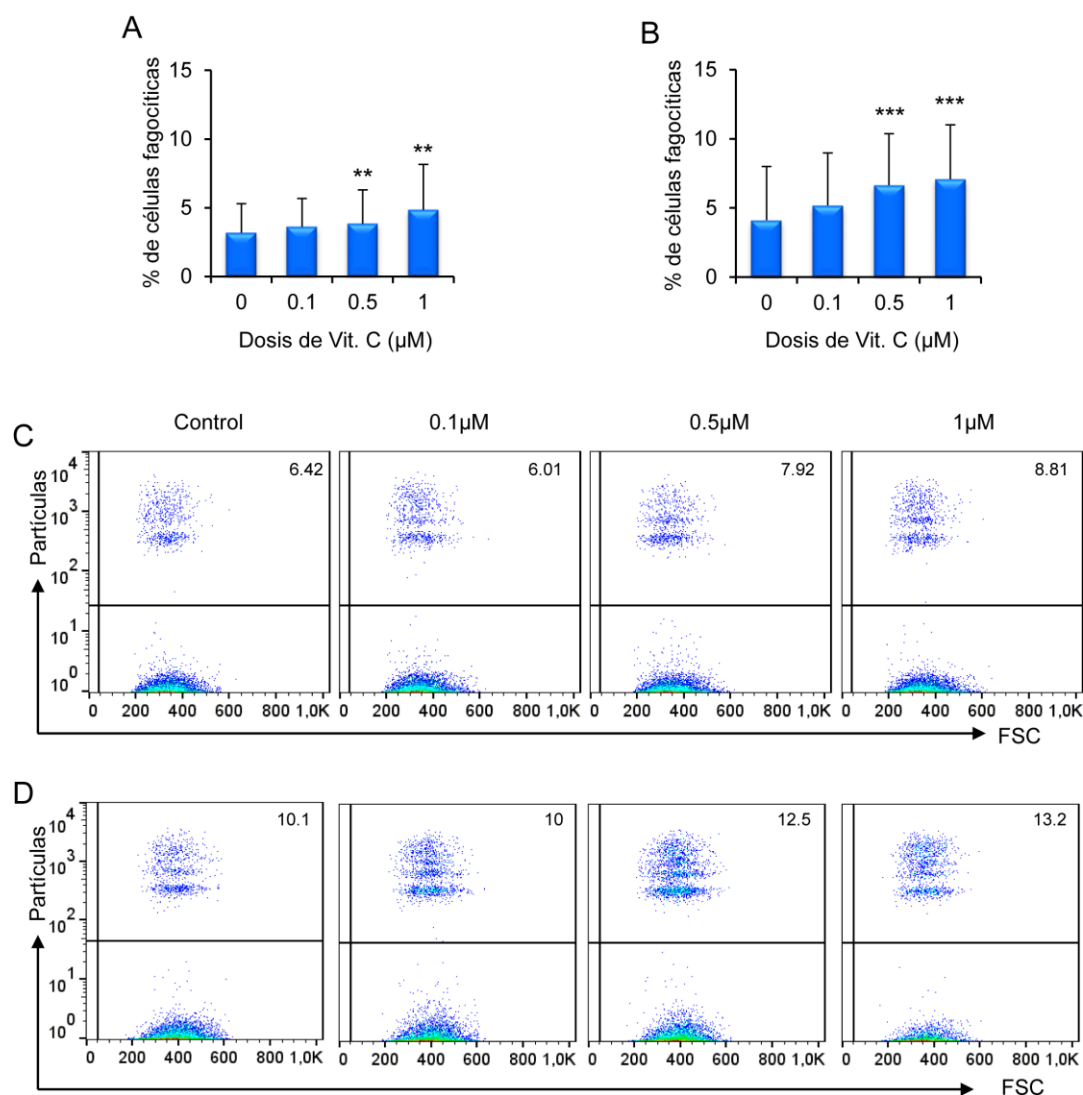
En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos en células RTS11. Cuando las células se incubaron con las esferas de poliestireno en presencia de 1  $\mu$ M de vitamina C, se produjo un aumento significativo del número de células fagocíticas (Fig. 30A). Sin embargo, en el caso de pre-incubar las células durante 24 horas con vitamina C antes de añadir las esferas de poliestireno, el número de células con capacidad fagocítica aumentó significativamente con todas las dosis de vitamina C utilizadas (Fig. 30B).



Cuando los mismos experimentos se realizaron con leucocitos de riñón, los resultados fueron ligeramente distintos. En este caso, el porcentaje de células con capacidad fagocítica aumentó significativamente con las dosis de vitamina C de 0.5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  tanto en el caso de co-incubar las células con la vitamina C y las partículas (Fig. 31A) como cuando las células se pre-incubaban con vitamina C 24 horas antes de realizar el ensayo de fagocitosis (Fig. 31B).



**Figura 30. Análisis del efecto de vitamina C en la capacidad fagocítica de células RTS11.** (A) Las células se co-incubaron con partículas fluorescentes Crimson Red en una proporción 1:10 (células:partículas) junto con diferentes dosis de vitamina C (0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) (B) Las células se pre-incubaron durante 24 horas con las mismas dosis de vitamina C y posteriormente se añadieron las partículas fluorescentes. En ambos casos, se incubaron las partículas con las células durante 3 horas a 20°C y posteriormente se analizó mediante citometría de flujo la internalización de partículas fluorescentes. Los resultados muestran la media del porcentaje de células que han internalizado las partículas + DE (n=9). Se aplicó una prueba *t* de Student y los asteriscos muestran las diferencias significativas entre el control (0) y las diferentes dosis de vitamina C (\*\*\*)  $p < 0.005$ ). Se muestran gráficos de citometría de flujo representativos para el experimento de co-incubación (C) y de pre-incubación (D), donde se indica el porcentaje de células fagocíticas (esquina superior derecha).



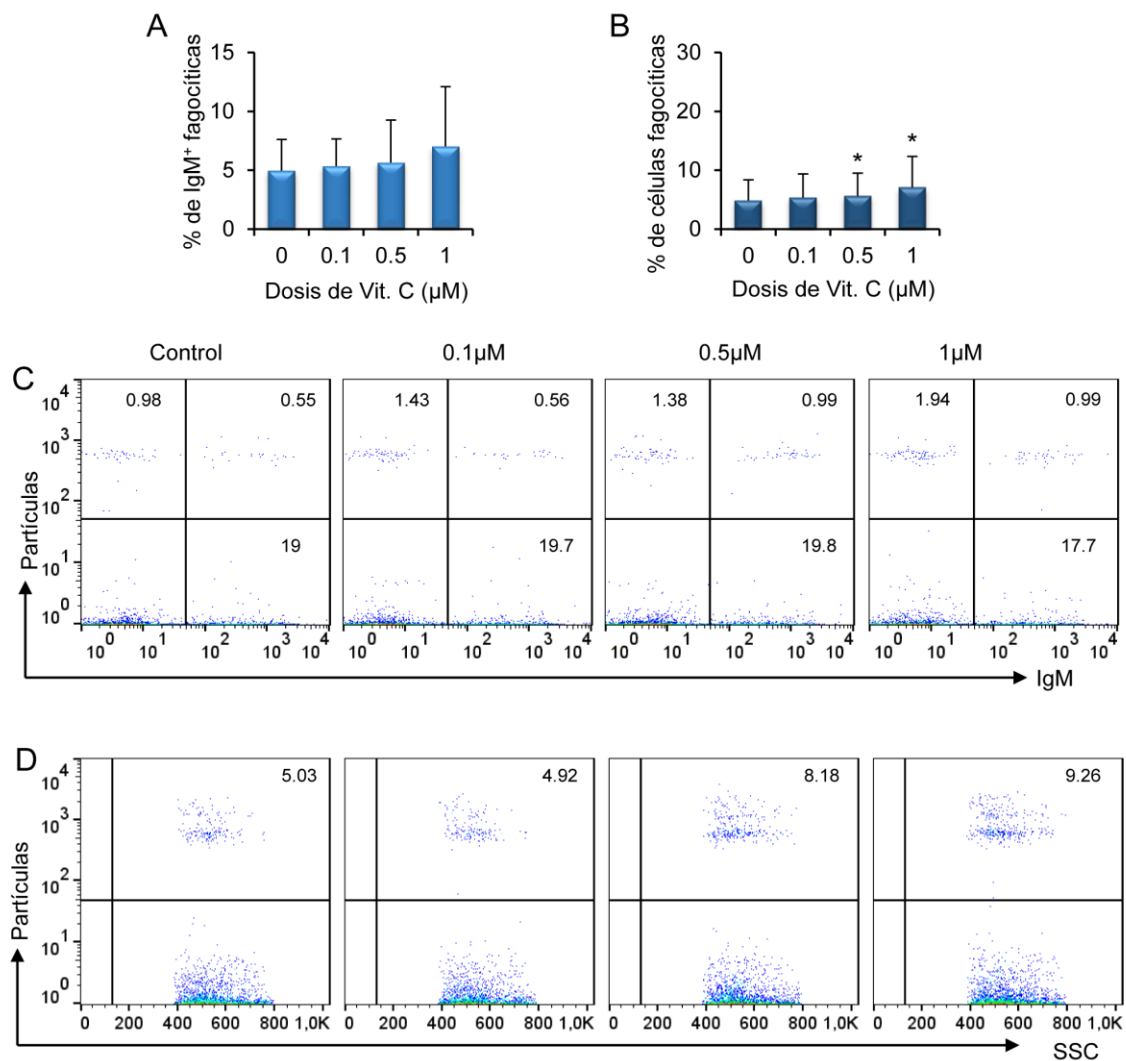
**Figura 31. Análisis del efecto de vitamina C en la capacidad fagocítica de leucocitos de riñón.** (A) Las células se co-incubaron con partículas fluorescentes Crimson Red en una proporción 1:10 (células:partículas) junto con diferentes dosis de vitamina C (0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) (B) Las células se pre-incubaron durante 24 horas con las mismas dosis de vitamina C y posteriormente se añadieron las partículas fluorescentes. En ambos casos, se incubaron las partículas con las células durante 3 horas a 20°C y posteriormente se analizó mediante citometría de flujo la internalización de partículas fluorescentes. Los resultados muestran la media del porcentaje de células que han internalizado las partículas + DE (n=9), Se aplicó una prueba *t* de Student y los asteriscos muestran las diferencias significativas entre el control (0) y las diferentes dosis de vitamina C (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ). Se muestran gráficos de citometría de flujo representativos para el experimento de co-incubación (C) y de pre-incubación (D), donde se indica el porcentaje de células fagocíticas (esquina superior derecha).

Habiendo establecido que la vitamina C incrementa el porcentaje de fagocitosis en leucocitos de riñón, quisimos comprobar qué sub-población era la afectada en estos cultivos por la vitamina C, ya que se sabe que en peces no sólo las células mieloides (macrófagos y neutrófilos) tienen capacidad fagocítica, sino también los linfocitos B (Li et al., 2006; Zhang et al., 2010). Para ello, se realizaron los experimentos de fagocitosis tal como se ha indicado anteriormente, pero esta vez las células se marcaron con un anticuerpo anti-IgM antes de analizar las muestras mediante citometría de flujo.

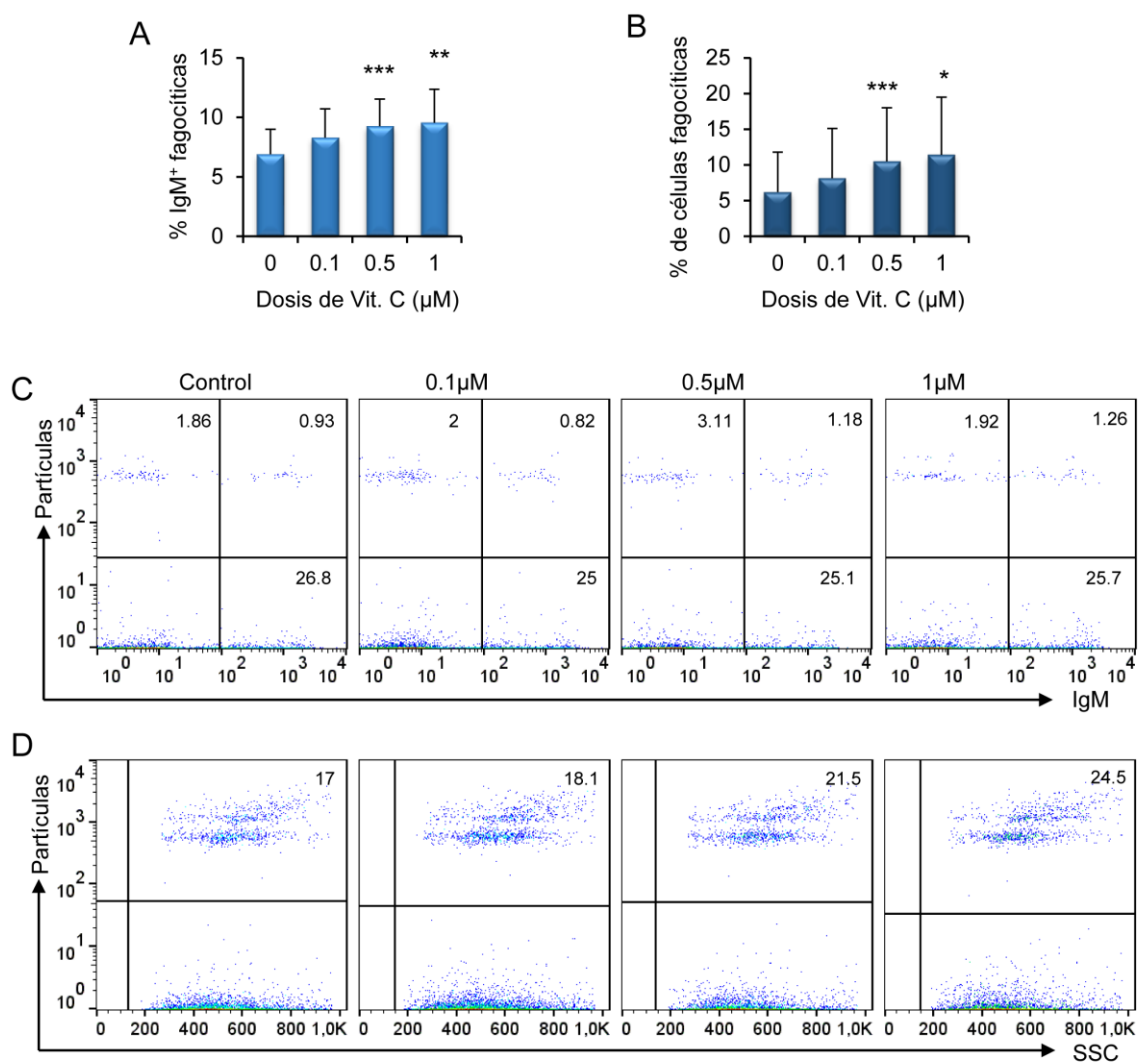
En los experimentos de co-incubación, no se observaron efectos significativos de la vitamina C sobre el porcentaje de células B con capacidad fagocítica (Fig. 32). Sin embargo, cuando los cultivos se incubaron previamente con vitamina C antes de realizar los ensayos, las dosis de 0.5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  aumentaron significativamente el porcentaje de células B con capacidad fagocítica (Fig. 33).

Por otro lado, también estudiamos los efectos de la vitamina C en la capacidad fagocítica de las células que se denominan mieloides en base a su perfil de gran tamaño y alta complejidad en citometría de flujo (Korytar et al., 2013). En este caso las dosis de 0.5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de vitamina C aumentaron el número de células fagocíticas tanto cuando la vitamina C se añadió conjuntamente con las partículas (Fig. 32A) como cuando se incubaba previamente con las células 24 horas antes de realizar el ensayo (Fig. 33B).

Es importante tener en cuenta que en todos los experimentos anteriores la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés *mean fluorescence intensity*) no variaba significativamente tras la adición de la vitamina C, sino únicamente el porcentaje de células con capacidad fagocítica, lo cual significa que la vitamina C ejerce su efecto aumentando el número de células fagocíticas pero no modificando la cantidad de partículas fluorescentes que cada célula ingiere.



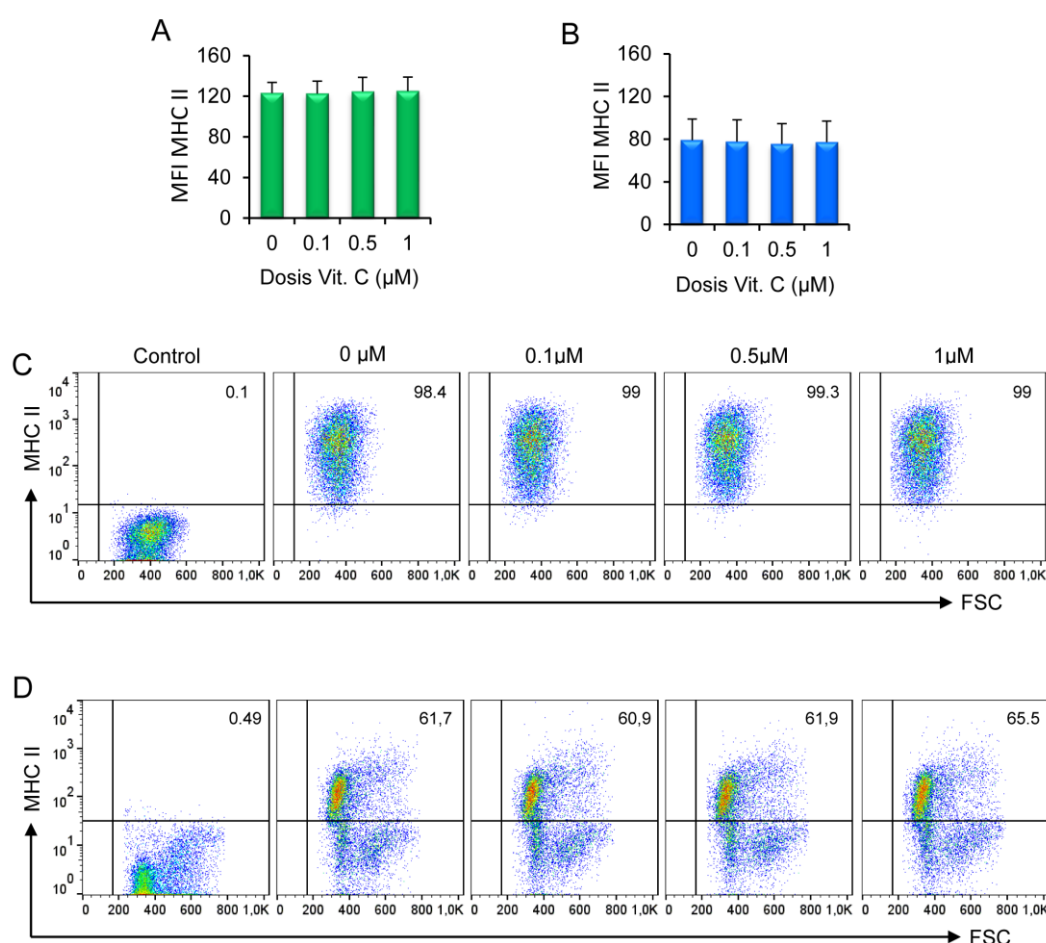
**Figura 32. Efecto de la co-incubación con vitamina C en la capacidad fagocítica de diferentes subpoblaciones de leucocitos de riñón.** Las células se co-incubaron con partículas fluorescentes Crimson Red en una proporción 1:10 (células:partículas) con diferentes dosis de vitamina C (0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) durante 3 horas a 20°C y posteriormente mediante citometría de flujo se analizó la fluorescencia de las partículas internalizadas en las células B, IgM<sup>+</sup> (C) o en células que se localizaron en la población mielóide según el perfil FSC/SSC (D). Los resultados muestran la media del porcentaje de células IgM<sup>+</sup> que internalizaron las partículas (A) y el porcentaje de células mieloides fagocíticas (B) + DE (n=6). Se aplicó una prueba *t* de Student y los asteriscos muestran las diferencias significativas entre el control (0) y las diferentes dosis de vitamina C (\* *p* < 0.05).



**Figura 33. Efecto de la pre-incubación con vitamina C en la capacidad fagocítica de diferentes subpoblaciones de leucocitos de riñón.** Las células se pre-incubaron con diferentes dosis de vitamina C (0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) durante 24 horas y posteriormente se añadieron las partículas fluorescentes Crimson Red en una proporción 1:10 (células:partículas). Posteriormente, se incubaron las partículas con las células durante 3 horas a 20°C y mediante citometría de flujo se analizó la fluorescencia de las partículas internalizadas en las células B, IgM<sup>+</sup> (C) o en células que se localizaron en la población mieloide según el perfil FSC/SSC (D). Los resultados muestran la media del porcentaje de células IgM<sup>+</sup> que internalizaron las partículas (A) y el porcentaje de células mieloides fagocíticas (B) + DE (n=6). Se aplicó un prueba *t* de Student y los asteriscos muestran las diferencias significativas entre el control (0) y las diferentes dosis de vitamina C (\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ).

#### 6.2.4. Efectos de la vitamina C en la expresión de MHCII en la superficie de RTS11 y leucocitos de riñón

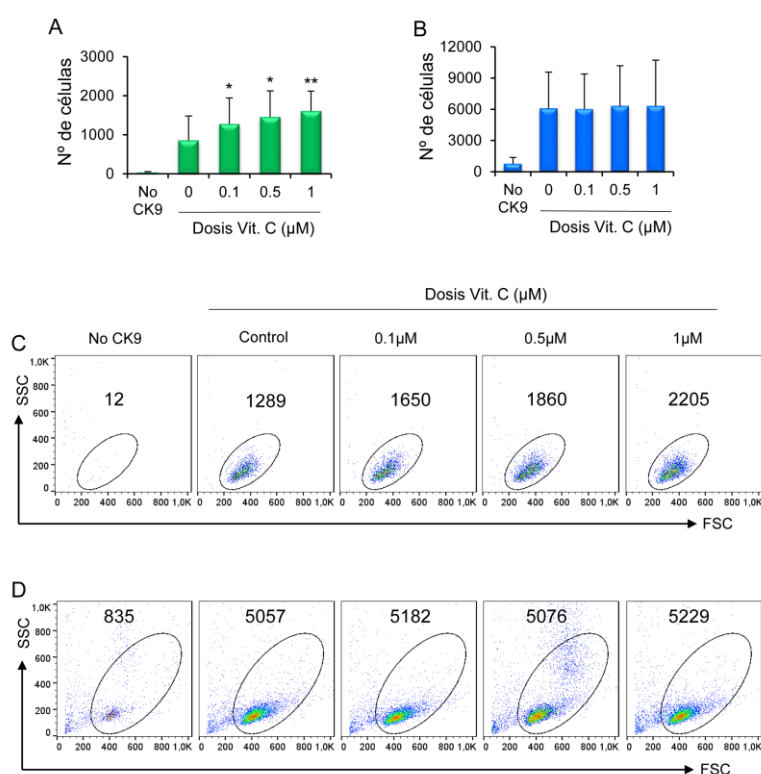
Una vez determinado que la vitamina C es capaz de incrementar el porcentaje de células fagocíticas, decidimos estudiar si también influía en la expresión de MHC II en la membrana celular, dado que en base a su naturaleza de células presentadoras, una vez internalizado el antígeno, éste puede ser degradado y presentado en MHC II. La Figura 34 muestra los resultados obtenidos en los que se puede ver que la cantidad de células expresando MHC II en la membrana, así como la MFI de MHC II en dichas células no varía en ninguna de las poblaciones analizadas tras la incubación con diferentes dosis de vitamina C.



**Figura 34. Efecto de la vitamina C en los niveles de expresión de MHC II.** Células RTS11 (A) y leucocitos de riñón (B) se incubaron con diferentes dosis de vitamina C (0, 0.1 μM, 0.5 μM y 1 μM) durante 24 horas, posteriormente se tiñeron con un anticuerpo anti-MHC II y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados muestran la MFI + DE (n=8). También se muestran gráficos de citometría de flujo representativos para RTS11 (C) y leucocitos de riñón (D), donde se indica el porcentaje de células MHCII<sup>+</sup> (esquina superior derecha).

### 6.2.5. Efectos de la vitamina C en la migración hacia CK9 de células RTS11 y leucocitos de riñón

CK9 es una quimioquina de trucha perteneciente al grupo CC, con capacidad quimioatrayente tanto para células RTS11 como para leucocitos de riñón (Aquilino et al., 2016). Por lo tanto, decidimos comprobar si la vitamina C era capaz de modular la migración de alguna de estas poblaciones hacia CK9. Como muestra la Figura 35, observamos una mayor migración de células RTS11 hacia CK9 al pre-incubar las células con las diferentes dosis de vitamina C durante 24 horas (Fig. 35A). Sin embargo, no observamos efectos significativos de la vitamina C en la capacidad migratoria de los leucocitos de riñón a este quimioquina (Fig. 35B).



**Figura 35. Efecto de la vitamina C en la capacidad migratoria de células RTS11 y leucocitos de riñón hacia CK9.** Para el ensayo de quimiotaxis, 10 ng/ml de CK9 recombinante de trucha se introdujeron en el compartimento inferior de cámaras de migración, mientras que las células RTS11 (A) o los leucocitos de riñón (B) previamente incubados durante 24 horas con diferentes dosis de vitamina C (0.1 μM, 0.5 μM, 1 μM) se añadieron en el compartimento superior. Tras 2 horas de incubación a 20°C, el número de células migradas al compartimento inferior se cuantificó mediante citometría de flujo (adquisición de 1 minuto en flujo constante). Se incluyeron controles negativos sin CK9. En la figura se representa la media del número de células migradas (n=9 en RTS11 y n=7 en leucocitos de riñón). Se aplicó un prueba *t* de Student y los asteriscos representan las diferencias significativas entre el control y las células incubadas con las diferentes dosis de vitamina C (\* *p* < 0.05 y \*\* *p* < 0.01). Se muestran gráficos de citometría de flujo representativos de RTS11 (C) y leucocitos de riñón (D) en los que se indica numéricamente la cantidad de células migradas.

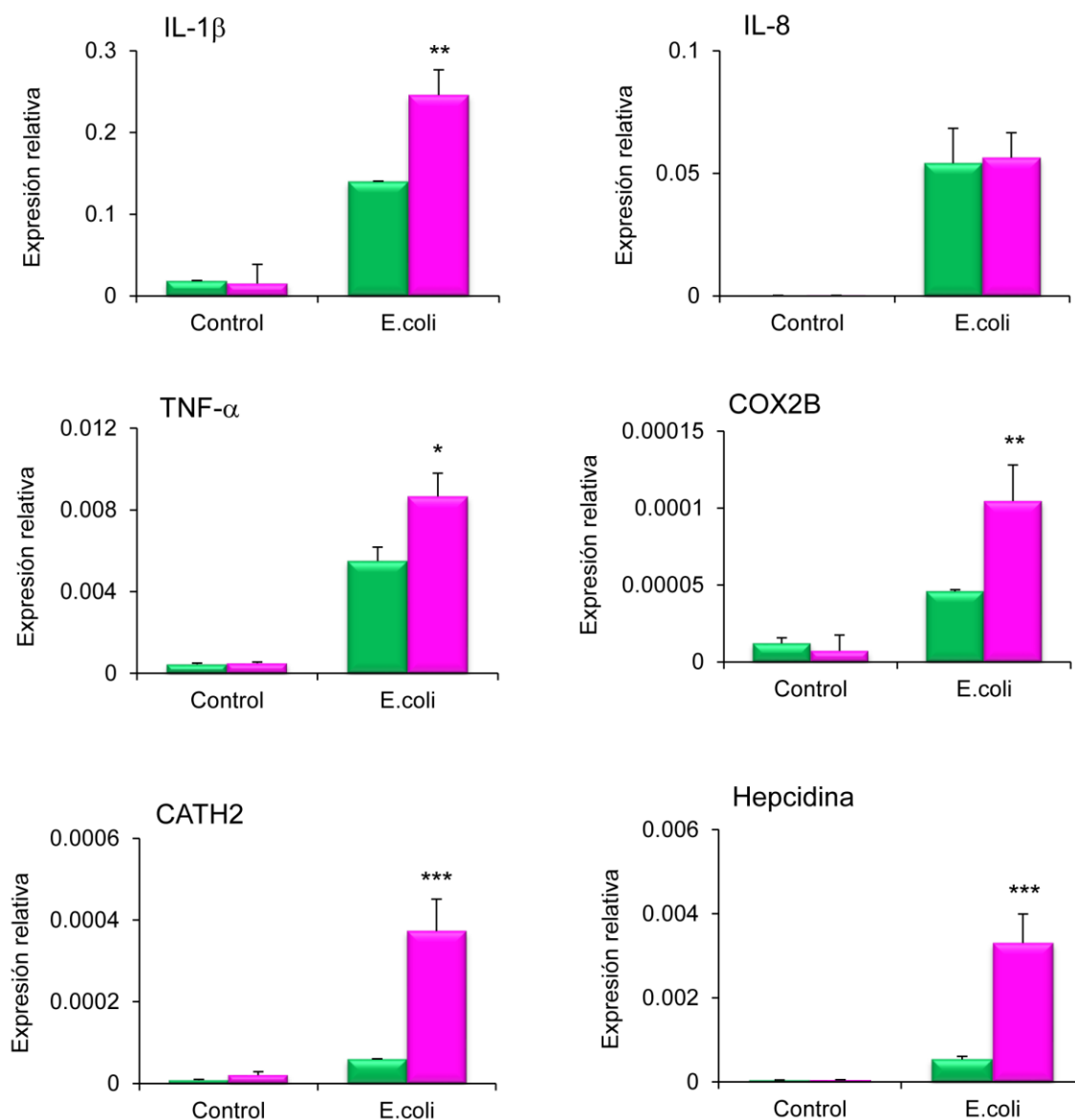
#### 6.2.6. Efectos de la vitamina C en la respuesta transcriptómica de RTS11 y leucocitos de riñón tras una exposición bacteriana

Para finalizar, estudiamos el efecto de la vitamina C en la transcripción de genes inmunitarios al exponer células RTS11 o leucocitos de riñón a *Escherichia coli*, en presencia o ausencia de 0.5  $\mu$ M de vitamina C.

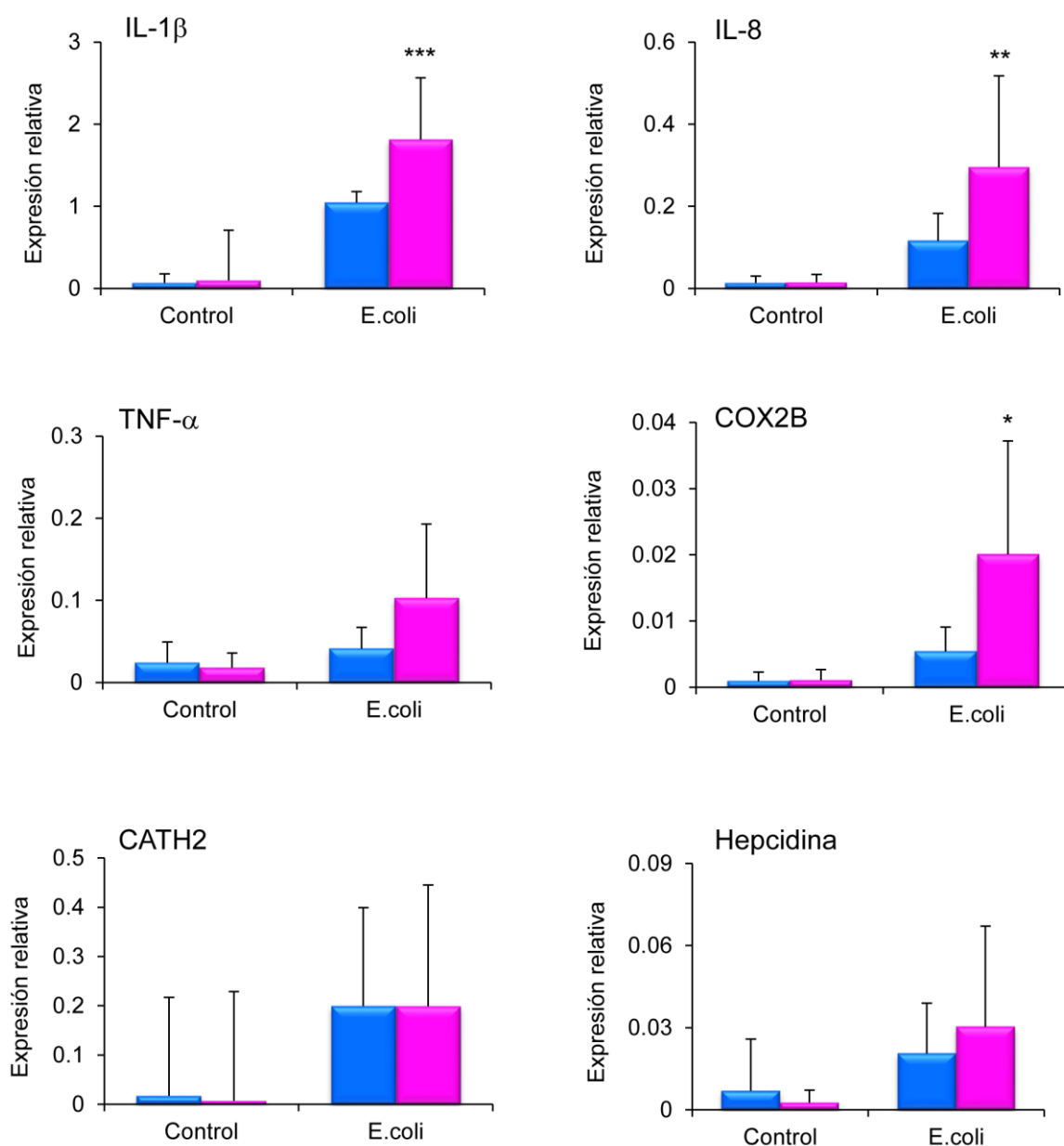
*E. coli* por sí sola aumentó los niveles de transcripción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF- $\alpha$ ; la enzima ciclo-oxigenasa 2B (COX-2B) responsable de la síntesis de eicosanoides, mediadores lipídicos de la inflamación; y los péptidos antimicrobianos catelicidina 2 y hepcidina en células RTS11 (Fig. 36). Cuando *E. coli* se añadió en presencia de vitamina C, los niveles de ARN aumentaron significativamente respecto a los obtenidos con *E. coli* sola en el caso de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2B, catelicidina 2 y hepcidina (Fig. 36). La vitamina C por sí sola no produjo ningún efecto en los niveles de transcripción de estos genes.

En el caso de los leucocitos de riñón, *E. coli* por sí sola aumentó los niveles de ARN de IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , COX-2B y hepcidina, pero no de catelicidina 2 (Fig. 37). En este caso, cuando *E. coli* se añadió a las células en presencia de vitamina C aumentaron los niveles de transcripción de IL-1 $\beta$ , IL8 y COX-2B respecto a los observados cuando se añadió únicamente la bacteria (Fig. 37). Tal como ocurría en el caso de las células RTS11, la vitamina C por sí sola no indujo ningún efecto en los niveles de transcripción de estos genes. Por lo tanto, estos datos sugieren que la vitamina C ayuda a las células a generar una respuesta inflamatoria al entrar en contacto con un agente infeccioso.





**Figura 36. Efecto de la vitamina C en la transcripción de genes inmunitarios de células RTS11 en respuesta a *E. coli*.** Las células RTS11 se incubaron durante 24 horas con *E. coli* (proporción célula:bacteria 1:10) en presencia o ausencia de 0.5  $\mu$ M de vitamina C. Se incluyeron controles sólo con vitamina C o con medio de cultivo. Se extrajo el ARN de las células y los niveles de transcripción de diversos genes inmunitarios se analizaron por PCR en tiempo real. Los datos muestran las medias de los niveles de expresión normalizados frente al gen de referencia EF-1 $\alpha$  + DE (n = 4). Se aplicó una prueba *t* de Student y los asteriscos muestran diferencias significativas entre los valores obtenidos en cultivos tratados con *E. coli* y vitamina C y los incubados con *E. coli* en ausencia de vitamina C (\*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.005$ ).



**Figura 37. Efecto de la vitamina C en la transcripción de genes inmunitarios de leucocitos de riñón en respuesta a *E. coli*.** Los leucocitos de riñón fueron incubados durante 24 horas con *E. coli* (proporción célula:bacteria 1:10) en presencia o ausencia de 0.5  $\mu$ M de vitamina C. Se incluyeron controles sólo con vitamina C o con medio de cultivo. Se extrajo el ARN de las células y los niveles de transcripción de diversos genes inmunitarios se analizaron por PCR a tiempo real. Los datos muestran las medias de los niveles de expresión normalizados frente a un gen de referencia (EF-1 $\alpha$ ) + DE (n = 4). Se aplicó una prueba *t* de Student y los asteriscos muestran diferencias significativas entre los valores obtenidos en cultivos tratados con *E. coli* y vitamina C y los incubados con *E. coli* en ausencia de vitamina C (\*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.05$ ).

### 6.3. Discusión

Durante los procesos de fagocitosis, las células fagocíticas activan el estallido respiratorio generando radicales libres de oxígeno como el superóxido o el peróxido de hidrógeno, que provocan efectos microbicidas y así contribuyen a la eliminación de los microorganismos fagocitados (Buettner, 1993). Debido a que la vitamina C es un potente antioxidante (Buettner, 1993), se había postulado que podría proteger a las células de productos generados en el estallido respiratorio (Parker et al., 2011).

Sin embargo, estudios realizados en neutrófilos de mamíferos demostraron que la vitamina C induce la generación de radicales libres de oxígeno en neutrófilos (Bozonet et al., 2015; Sharma et al., 2004). Los mecanismos por los que la vitamina C induce la producción de superóxido en mamíferos se desconocen en la actualidad, aunque se ha sugerido que puede estar mediada por efectos de la vitamina en la expresión de las diferentes subunidades de la oxidasa responsable, o en modificaciones postraduccionales de dichas subunidades (Bozonet et al., 2015).

En este Capítulo, demostramos como la vitamina C incrementa la producción de radicales libres de oxígeno en células RTS11 y en leucocitos de riñón de trucha arcoíris, de forma similar a lo observado en los neutrófilos de mamíferos. Este resultado corrobora estudios previos realizados en otras especies de peces, en los que se observó que un suplemento de vitamina C en la dieta aumentaba el estallido respiratorio de leucocitos (Kumari y Sahoo, 2005; Lin y Shiau, 2005; Ortuno et al., 2001; Tewary y Patra, 2008).

Sin embargo, en algunas especies se han descrito efectos contrarios con disminución del estallido respiratorio en respuesta a vitamina C. Así, por ejemplo, en el mero de roca (*Polyprion oxygeneios*) la vitamina C disminuye la producción de superóxido (Salinas et al., 2012) y en el caso de la dorada, la vitamina C por sí sola no consiguió desencadenar el estallido respiratorio, sino que sólo lo hizo en combinación con vitamina E (Mulero et al., 1998). Sorprendentemente, en esta última especie la vitamina C es capaz de incrementar el estallido respiratorio si se utiliza como suplemento en la dieta (Ortuno et al., 2001). Por tanto, es posible que las diferencias encontradas en algunos casos sean dependientes del modelo experimental utilizado.

Una vez establecidos los efectos de la vitamina C en el estallido respiratorio, estudiamos sus efectos sobre la capacidad fagocítica de células RTS11 y de leucocitos de trucha. En ambos casos la vitamina C provoca un aumento significativo del porcentaje de células fagocíticas, mientras que no tiene efectos sobre el número de partículas ingeridas por célula.

En mamíferos, por el contrario, la incubación de leucocitos de sangre con vitamina C incrementa el número de partículas de látex fagocitadas por cada célula polimorfonuclear, mientras que el número de células fagocíticas permanece invariable (Bergman et al., 2004). En cualquier caso, nuestros resultados están en concordancia con un estudio previo en el que se determinó un efecto positivo del suplemento dietético con vitamina C en la fagocitosis en leucocitos en carpa india (Tewary y Patra, 2008).

Una vez establecido el efecto positivo de la vitamina C sobre la capacidad fagocítica de leucocitos, quisimos investigar a qué tipo de células estaba afectando la vitamina C, ya que en estos cultivos podrían estar fagocitando partículas tanto células mieloides (macrófagos o neutrófilos) como linfocitos B. De esta forma, pudimos comprobar que tanto las células B como las células mieloides respondieron a la vitamina C, demostrando que esta vitamina regula esta función en diferentes tipos celulares.

Dado que la vitamina C incrementa la capacidad quimiotáctica de neutrófilos en humanos (Bozonet et al., 2015), en este Capítulo también estudiamos el efecto de la vitamina C en la migración de células de trucha hacia CK9, ya que esta quimioquina pertenece al grupo de las quimioquinas CC y atrae específicamente a monocitos/macrófagos y células B de diferentes tejidos (Aquilino et al., 2016). La vitamina C aumentó la capacidad migratoria de las células RTS11 hacia CK9, mientras que no produjo efectos significativos en la capacidad de los leucocitos de riñón para migrar hacia esta quimioquina. Por lo tanto, parece que la vitamina C puede aumentar de manera específica la capacidad migratoria de monocitos-migratorios (RTS11) pero no otros tipos celulares residentes en riñón.

De una manera similar, en mamíferos se ha descrito que la regulación de la migración de los neutrófilos en respuesta a la vitamina C, es fruto de efectos en el reordenamiento del citoesqueleto, ya que no se observó ningún efecto en los niveles de expresión de los receptores de quimioquinas correspondientes (Schwager et al., 2015). Este efecto no puede ser aun valorado en trucha arcoíris, puesto que el receptor de CK9 no ha sido identificado aún.

También obtuvimos diferentes respuestas dependiendo del tipo celular cuando se estudiaron los efectos de la vitamina C en la respuesta transcripcional a *E. coli* en RTS11 y leucocitos de riñón.

En las células RTS11, los niveles de transcripción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , COX-2B, catelicidina 2 y hepcidina en respuesta a la bacteria se incrementaron aún más en presencia de vitamina C, mientras que la vitamina C no produjo un efecto significativo en los niveles de transcripción de IL-8. Cuando se realizó el mismo experimento en leucocitos de riñón, la vitamina C sólo fue capaz de elevar los niveles de transcripción de IL-1 $\beta$ , IL-8 y COX-2B en respuesta a *E. coli*. Estas diferencias podrían deberse a que en la población de leucocitos de riñón anterior coexisten diversos subtipos de leucocitos en los que la vitamina C podría tener efectos diferentes, mientras que los efectos son más fáciles de visualizar utilizando una línea celular relativamente homogénea.

El efecto de la vitamina C en la producción de péptidos antimicrobianos ya se había demostrado indirectamente en carpas chinas jóvenes (*Ctenopharyngodon idella*), en las que se estableció que la deficiencia de vitamina C en la dieta, daba lugar a una disminución de los niveles de transcripción de péptidos antimicrobianos en el hígado (Xu et al., 2016a).

En resumen, en este Capítulo hemos demostrado que la vitamina C modula directamente varias funciones inmunitarias de la trucha arcoíris. Los resultados obtenidos con monocitos/macrófagos RTS11 y leucocitos del riñón anterior revelan un efecto positivo de la vitamina C sobre la respuesta inmunitaria antibacteriana de la trucha arcoíris, ya que los efectos positivos de la vitamina sobre la producción de radicales de oxígeno, la capacidad fagocítica y la producción de factores pro-inflamatorios y antimicrobianos muy probablemente se traducirán en una mejor actividad microbicida. Por lo tanto, nuestros resultados aportan evidencias que contribuyen a explicar los mecanismos a través de los cuales la suplementación con vitamina C mejora la supervivencia a los patógenos bacterianos en los peces.



## Discusión general





En la actualidad, la acuicultura se ha establecido como una actividad económica sólida dentro del ámbito de la producción animal. Ésta proporcionó un 39% del pescado para consumo humano en 2004 lo que hace de esta actividad una fuente básica en el aporte proteico y lipídico para el sustento de la creciente población mundial (Informe SOFIA, 2016). El alimento representa el mayor coste porcentual de la producción de peces en cautividad, y por lo tanto, la sostenibilidad del proceso productivo requiere una actualización de las fuentes de materias primas utilizadas en la elaboración de piensos (Sargent y Tacon, 1999). Uno de los principales problemas de la acuicultura, como ocurre en otros sectores productivos de animales, son las pérdidas generadas por la aparición de enfermedades infecciosas. Dentro de este tipo de enfermedades, las producidas por virus son unas de las más graves, como consecuencia de la falta de tratamientos eficaces y de las altas mortalidades con las que suelen cursar. VHSV es uno de los virus que mayores pérdidas provoca en la acuicultura de salmónidos a nivel mundial y por lo tanto, ha sido el utilizado en esta Tesis para analizar la respuesta inmunitaria de la trucha arcoíris en los distintos Capítulos.

La vacunación es el método de prevención más adecuado para evitar la aparición de enfermedades víricas, sin embargo, apenas existen vacunas antivirales en el mercado debido a su baja efectividad. Asimismo, la mayoría de las vacunas disponibles frente a virus conllevan inyección, generando situaciones de estrés en los peces, lo cual podría provocar efectos inmunosupresores que interfieran con la efectividad de la respuesta inmunitaria generada. Por lo tanto, es esencial optimizar nuevos métodos de administración de vacunas, así como otros tratamientos orales que no conlleven la manipulación de los peces uno por uno. Para todo ello, es fundamental comprender como se regula el sistema inmunitario de los peces, especialmente en mucosas, algo que todavía no se ha estudiado en profundidad en la mayoría de las especies.

Por estos motivos, en el Capítulo 1 de esta Tesis se ha caracterizado el sistema inmunitario de la piel de trucha arcoíris, estudiando la transcripción de distintos genes inmunitarios a lo largo de las distintas zonas de la piel, determinado el número de células T por citometría e inmunohistoquímica y analizando la respuesta a VHSV. Así, hemos podido comprobar que los linfocitos B y T no se encuentran distribuidos de forma homogénea por la piel, ya que la zona adyacente a las branquias es más rica en estos tipos celulares que las zonas más posteriores.

El hecho de que las células estén polarizadas hacia el extremo anterior, podría ser debido a la proximidad al timo, órgano linfoide primario donde los linfocitos T maduran y a partir del cual colonizan otros tejidos durante el desarrollo. Una vez las células T están localizadas, pueden atraer a células B mediante la acción de quimioquinas específicas, que también aparecen más representadas en estas zonas. Dado que hemos comprobado que en otra especie como el rodaballo se observa esta misma heterogeneidad, parece que este fenómeno podría ser común en los teleósteos. Por otro lado, la distribución heterogénea de las células inmunitarias en la piel podría ser clave para entender por qué frente a algunos patógenos son más frecuentes las lesiones en las zonas posteriores de la piel (Maddocks et al., 2015; Oidtmann et al., 2013; Peeler et al., 2014). Asimismo, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la toma de muestras en la misma sección de la piel cuando se lleven a cabo estudios inmunitarios.

En el Capítulo 1 también hemos comprobado cómo la piel es un órgano rico en células T. Nuestros resultados sugieren que en este tejido, coexisten varios de estos subtipos de linfocitos T capaces de activar respuestas inmunitarias diferentes en respuesta a los diversos estímulos con los que se vaya encontrando el pez. En condiciones basales, nuestros estudios, así como los de otros autores (Takizawa et al., 2011b) parecen apuntar hacia el predominio de una respuesta de perfil Th2, aunque también hemos comprobado la transcripción de marcadores de células Th1, Treg y Th17. Por otra parte, hemos visto como estas células son capaces de responder a estímulos regulándose a nivel local en respuesta a una infección viral. Estos resultados sugieren que la piel podría estar actuando como órgano linfoide secundario, en el cual existen células B, capaces de captar y presentar antígenos a células T, que se activarían directamente a nivel local dada la ausencia de ganglios linfáticos en peces.

Una vez estudiada la regulación de la respuesta inmunitaria frente a virus en la piel, en el segundo Capítulo de esta Tesis Doctoral, hemos querido determinar el efecto de una alimentación con una dieta suplementada en inmunoestimulantes y vitaminas, sobre la respuesta antiviral a nivel de varios órganos. La utilización indiscriminada de antibióticos en la acuicultura ha provocado la generación de bacterias resistentes, así como la eliminación de bacterias beneficiosas que compiten con microorganismos patógenos, dificultando así la respuesta inmunitaria de los animales (Lunden y Bylund, 2002; Serezli, 2005) y perjudicando gravemente el medio ambiente.

Por esa razón, emerge la demanda de productos orgánicos, que no vulneren el medio ambiente, que reduzcan la mortalidad y mejoren la sostenibilidad y la calidad de los productos acuícolas. Si bien algunos inmunoestimulantes y probióticos responden a esta necesidad, se requiere una investigación rigurosa en diferentes especies que validen su efectividad para la mejora de la salud y supervivencia de los peces, reduciendo lo máximo posible el uso de antibióticos.

Dentro de los inmunoestimulantes más utilizados en peces, se encuentran los  $\beta$ -glucanos, principalmente extraídos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Ai et al., 2007; Kuhlwein et al., 2013; Rodriguez et al., 2003). La dieta utilizada en el Capítulo 2, Protec™, contiene  $\beta$ -glucanos así como vitaminas C y E, zinc, y extractos naturales de plantas con actividad inmunoestimulante. Cómo se ha explicado anteriormente, el tiempo durante el cual se debe administrar un inmunoestimulante para obtener unos resultados óptimos no es algo que se haya estudiado en peces, a pesar de que es posible que la administración reiterada de una sustancia que el organismo catalogue como extraña, pueda acabar por generar mecanismos de tolerancia inmunitaria en los que dicha sustancia ya no desencadene la respuesta inmunitaria deseada (Huttenhuis et al., 2006; Joosten et al., 1997). Por lo tanto, en nuestro trabajo comparamos los efectos observados tras un tiempo de administración de 15 días con los obtenidos tras 30 días de alimentación.

En ausencia de infección, de forma general, los niveles de expresión de los distintos genes inmunitarios fueron mayores en los peces alimentados con Protec™ durante 15 días, lo que parecía predecir una mejor respuesta inmunitaria frente al virus en comparación con los peces que se alimentaron con esta dieta durante 30 días. Sin embargo, una vez los animales se enfrentaron al virus, fueron los peces alimentados con Protec™ durante 30 días en los que se encontró una mejor respuesta. Por lo tanto, no parece que tras 30 días de estimulación se esté dando tolerancia inmunitaria frente a los ingredientes activos de esta dieta. Esta respuesta no sólo se observó en los niveles transcripcionales de los marcadores estudiados, sino que el título de anticuerpos naturales también fue mayor en estos peces, lo que pudo limitar la replicación viral de una forma más eficaz.

Habiendo establecido que la dieta Protec™ confería una mayor respuesta antiviral en los peces, quisimos analizar en profundidad los efectos inmunitarios de uno de sus ingredientes activos, la vitamina C, lo cual llevamos a cabo en el Capítulo 3. Las vitaminas son esenciales en las dietas de peces y por tanto, se han descrito numerosos trabajos acerca de sus efectos en las diferentes etapas del desarrollo.

Diversos estudios en mamíferos y peces han demostrado que una dieta rica en vitamina C afecta de forma positiva a diversas funciones del sistema inmunitario (Prinz et al., 1977; Sharma et al., 2004), sin embargo las bases de cómo esta vitamina es capaz de regular estas funciones no se conocen en la actualidad ni en peces ni en mamíferos. Por este motivo, quisimos analizar en profundidad los efectos de la vitamina C utilizando dos sistemas *in vitro*. Por un lado, se utilizaron las células RTS11, una línea establecida de células monocito-macrófago que han sido de gran utilidad para llevar a cabo diversos estudios inmunitarios (Montero et al., 2008; Ordas et al., 2011; Sever et al., 2014). Por otro lado, los resultados obtenidos en RTS11 se compararon con los observados en cultivos primarios de leucocitos de riñón, donde coexisten distintos tipos celulares que incluyen células B en todos sus estadios de desarrollo, células mieloides como macrófagos o neutrófilos y algunos linfocitos T (Irwin y Kaatari, 1986; Press et al., 1994). Nuestros resultados ponen de manifiesto como la vitamina C incrementa la capacidad fagocítica, el estallido respiratorio, la respuesta pro-inflamatoria y la transcripción de péptidos antimicrobianos en ambos modelos, lo cual podría explicar los mecanismos a través de los cuales la vitamina C en la dieta aumenta la resistencia a enfermedades bacterianas (Buettner, 1993; Chatterjee et al., 2008), ya que todas estas funciones están directamente relacionadas con la respuesta antibacteriana.

Por lo tanto, a lo largo de esta Tesis hemos estudiado la regulación de la respuesta inmunitaria en una mucosa como la piel; para a continuación analizar los efectos de una dieta suplementada en la respuesta inmunitaria tanto de mucosas como sistémica; y finalmente estudiar más en profundidad como uno de los componentes de esta dieta es capaz de regular la respuesta inmunitaria. Estos estudios han contribuido a aumentar el conocimiento de la regulación de la respuesta inmunitaria de mucosas en trucha arcoíris, así como a entender los mecanismos a través de los cuales las dietas suplementadas y algunos de sus ingredientes activos ejercen sus funciones. Nuestros estudios futuros continuarán analizando cómo el resto de ingredientes activos modulan el sistema inmunitario de los peces, especialmente en las mucosas, ya que estas constituyen las primeras barreras en las que frenar el avance de los patógenos.

## Conclusiones



1. Los linfocitos B y T no se distribuyen homogéneamente en la piel de los peces, siendo la zona adyacente a las branquias más rica en estos tipos celulares que la zona posterior.
2. La piel es un órgano rico en células T, siendo éstas capaces de responder a estímulos, regulándose a nivel local en respuesta a una infección viral, lo que sugiere su posible papel como órgano linfoide secundario, en el cual existen células B y T que se activan directamente frente a un estímulo.
3. En condiciones de homeostasis, el perfil predominante de células Th en la piel es principalmente de tipo Th2, aunque también se ha observado transcripción de marcadores de células Th1, Treg y Th17.
4. La dieta Protec™ suplementada con distintos inmunoestimulantes y vitaminas provoca efectos sobre los niveles de transcripción de inmunoglobulinas, perforina e IL-8 en comparación a los niveles observados en peces alimentados con una dieta control.
5. La dieta Protec™ induce un aumento de los niveles de anticuerpos naturales en suero de trucha arcoíris, lo que podría explicar el mejor control de la replicación de VHSV que se observa en los animales alimentados con esta dieta.
6. Los peces alimentados con Protec™ durante 30 días responden mejor al virus y controlan de una forma más eficiente la infección viral que los alimentados con esta dieta únicamente durante 15 días.
7. La vitamina C incrementa la capacidad fagocítica de las células RTS11 y de los leucocitos de riñón anterior, actuando en estos últimos tanto sobre células mieloides como sobre células B fagocíticas.
8. La vitamina C induce el estallido respiratorio en células RTS11 y leucocitos de riñón de trucha arcoíris, activando además una respuesta pro-inflamatoria y la transcripción de péptidos antimicrobianos en estas células. Todos estos efectos podrían explicar el aumento de la resistencia a enfermedades bacterianas, observado en peces alimentados con dietas suplementadas con vitamina C.





## Bibliografía



- Abelli, L., Baldassini, M.R., Mastrolia, L., Scapigliati, G., 1999. Immunodetection of lymphocyte subpopulations involved in allograft rejection in a teleost, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Cell Immunol* 191, 152-160.
- Abos, B., Castro, R., Pignatelli, J., Luque, A., Gonzalez, L., Tafalla, C., 2013. Transcriptional heterogeneity of IgM(+) cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Tissues. *PLoS One* 8, e82737.
- Aggad, D., Mazel, M., Boudinot, P., Mogensen, K.E., Hamming, O.J., Hartmann, R., Kotenko, S., Herbomel, P., Lutfalla, G., Levraud, J.P., 2009. The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains. *J Immunol* 183, 3924-3931.
- Ahne, W., 1982. Comparative studies on the stability of 4 fish-pathogenic viruses VHSV, PFR, SVCV, IPNV. *zentralblatt für veterinärmedizin reihe B-Journal of veterinary medicine series B-infectious diseases immunology food hygiene veterinary public health* 29, 457-476.
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H., 2007. Effects of dietary beta-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol* 22, 394-402.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 127, 701-721 e701-770.
- Alejo, A., Tafalla, C., 2011. Chemokines in teleost fish species. *Dev Comp Immunol* 35, 1215-1222.
- Alexander, J.V., Ingram, G.A., 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Ann Rev Fish Dis* 2, 249-279.
- Allen, A., Hutton, D., McQueen, S., Garner, A., 1983. Dimensions of gastroduodenal surface pH gradients exceed those of adherent mucus gel layers. *Gastroenterology* 85, 463-466.
- Altmann, S.M., Mellon, M.T., Distel, D.L., Kim, C.H., 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J Virol* 77, 1992-2002.
- Amend, D.P., Wedemeyer, G., 1970. Approved procedure for determining absence of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in certain fish and fish products. *Fish Disease Leaflet* 27, 4.
- Aquilino, C., Castro, R., Fischer, U., Tafalla, C., 2014. Transcriptomic responses in rainbow trout gills upon infection with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dev Comp Immunol* 44, 12-20.
- Aquilino, C., Granja, A.G., Castro, R., Wang, T., Abos, B., Parra, D., Secombes, C.J., Tafalla, C., 2016. Rainbow trout CK9, a CCL25-like ancient chemokine that attracts and regulates B cells and macrophages, the main antigen presenting cells in fish. *Oncotarget* 7, 17547-17564.
- Aspehaug, V., Falk, K., Krossoy, B., Thevarajan, J., Sanders, L., Moore, L., Endresen, C., Biering, E., 2004. Infectious salmon anemia virus (ISAV) genomic segment 3 encodes the viral nucleoprotein (NP), an RNA-binding protein with two monopartite nuclear localization signals (NLS). *Virus Res* 106, 51-60.

- Balla, K.M., Lugo-Villarino, G., Spitsbergen, J.M., Stachura, D.L., Hu, Y., Banuelos, K., Romo-Fewell, O., Aroian, R.V., Traver, D., 2010. Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. *Blood* 116, 3944-3954.
- Ballesteros, N.A., Castro, R., Abos, B., Rodriguez Saint-Jean, S.S., Perez-Prieto, S.I., Tafalla, C., 2013a. The pyloric caeca area is a major site for IgM(+) and IgT(+) B cell recruitment in response to oral vaccination in rainbow trout. *PLoS One* 8, e66118.
- Ballesteros, N.A., Rodriguez Saint-Jean, S., Perez-Prieto, S.I., Aquilino, C., Tafalla, C., 2013b. Modulation of genes related to the recruitment of immune cells in the digestive tract of trout experimentally infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or orally vaccinated. *Dev Comp Immunol* 44, 195-205.
- Bao, B., Peatman, E., Peng, X., Baoprasertkul, P., Wang, G., Liu, Z., 2006. Characterization of 23 CC chemokine genes and analysis of their expression in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 30, 783-796.
- Barik, S., Rud, E.W., Luk, D., Banerjee, A.K., Kang, C.Y., 1990. Nucleotide sequence analysis of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* 175, 332-337.
- Barreda, D.R., Hanington, P.C., Belosevic, M., 2004. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28, 509-554.
- Barros, M.M., Falcon, D.R., Orsi Rde, O., Pezzato, L.E., Fernandes, A.C., Jr., Guimaraes, I.G., Fernandes, A., Jr., Padovani, C.R., Sartori, M.M., 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed beta-glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* 39, 188-195.
- Bassity, E., Clark, T.G., 2012. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One* 7, e33196.
- Basurco, B., Coll, J.M., 1992. In vitro studies and *in vivo* immunisation with the first viral haemorrhagic septicaemia viruses isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Res Vet Sci* 53, 93-97.
- Bergman, M., Salman, H., Djaldetti, M., Fish, L., Punskey, I., Bessler, H., 2004. *In vitro* immune response of human peripheral blood cells to vitamins C and E. *J Nutr Biochem* 15, 45-50.
- Biacchesi, S., Thoulouze, M.I., Bearzotti, M., Yu, Y.X., Bremont, M., 2000. Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J Virol* 74, 11247-11253.
- Bird, S., Tafalla, C., 2015. Teleost chemokines and their receptors. *Biology (Basel)* 4, 756-784.
- Blaxhall, P.C., Sheard, P.R., 1985. Preliminary investigation of the characteristics of fish lymphocytes separated on a Percoll discontinuous gradient. *J Fish Bio* 26, 209-216.

- Bly, J.E., Clem, L.W., 1991. Temperature-mediated processes in teleost immunosuppression induced by *in vivo* low temperature in channel catfish. *Vet Immunol Immunopathol* 28, 365-377.
- Boardman, T., Warner, C., Ramirez-Gomez, F., Matrisciano, J., Bromage, E., 2012. Characterization of an anti-rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CD3epsilon monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol* 145, 511-515.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Boes, M., 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 37, 1141-1149.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., Born, W.K., 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10, 467-478.
- Bootland, L.M., Leong, J.A., 1992. Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl Env Microbiol* 58, 6-13.
- Bozonet, S.M., Carr, A.C., Pullar, J.M., Vissers, M.C., 2015. Enhanced human neutrophil vitamin C status, chemotaxis and oxidant generation following dietary supplementation with vitamin C-rich SunGold kiwifruit. *Nutrients* 7, 2574-2588.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 19(5), 457-72.
- Bromage, E.S., Kaattari, I.M., Zwollo, P., Kaattari, S.L., 2004. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *J Immunol* 173, 7317-7323.
- Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300, 535-543.
- Buonocore, F., Randelli, E., Bird, S., Secombes, C.J., Costantini, S., Facchiano, A., Mazzini, M., Scapigliati, G., 2006. The CD8alpha from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Cloning, expression and 3D modelling. *Fish Shellfish Immunol* 20, 637-646.
- Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Guerra, L., Picchiatti, S., Costantini, S., Facchiano, A.M., Zou, J., Secombes, C.J., Scapigliati, G., 2008. A CD4 homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): molecular characterization and structural analysis. *Mol Immunol* 45, 3168-3177.
- Cai, Z., Gao, C., Zhang, Y., Xing, K., 2009. Functional characterization of the ELR motif in piscine ELR<sup>+</sup>CXC-like chemokine. *Mar Biotechnol (NY)* 11, 505-512.
- Caipang, C.M.A., Hirono, I., Aoki, T., 2003. *In vitro* inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology* 317, 373-382.
- Casadei, E., Wang, T., Zou, J., Gonzalez Vecino, J.L., Wadsworth, S., Secombes, C.J., 2009. Characterization of three novel beta-defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Immunol* 46, 3358-3366.
- Castric, J., 1997. Viral diseases in fish mariculture. *Bull EAFP* 17, 220-228.
- Castro, R., Abos, B., Pignatelli, J., von Gersdorff Jorgensen, L., Gonzalez Granja, A., Buchmann, K., Tafalla, C., 2014a. Early immune responses in rainbow trout liver upon viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *PLoS One* 9, e111084.
- Castro, R., Bromage, E., Abos, B., Pignatelli, J., Gonzalez Granja, A., Luque, A., Tafalla, C., 2014b. CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> B lymphocyte subset. *J Immunol* 192, 1257-1266.

- Castro, R., Jouneau, L., Pham, H.P., Bouchez, O., Giudicelli, V., Lefranc, M.P., Quillet, E., Benmansour, A., Cazals, F., Six, A., Fillatreau, S., Sunyer, O., Boudinot, P., 2013a. Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *PLoS Pathog* 9, e1003098.
- Castro, R., Martinez-Alonso, S., Fischer, U., Haro, N.A., Soto-Lampe, V., Wang, T., Secombes, C.J., Lorenzen, N., Lorenzen, E., Tafalla, C., 2013b. DNA vaccination against a fish rhabdovirus promotes an early chemokine-related recruitment of B cells to the muscle. *Vaccine*.
- Chang, Y.H., Huang, C.N., Wu, C.Y., Shiau, M.Y., 2005. Association of interleukin-10 A-592C and T-819C polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Hum Immunol* 66, 1258-1263.
- Chatterjee, M., Saluja, R., Kumar, V., Jyoti, A., Kumar Jain, G., Kumar Barthwal, M., Dikshit, M., 2008. Ascorbate sustains neutrophil NOS expression, catalysis, and oxidative burst. *Free Radic Biol Med* 45, 1084-1093.
- Chaves-Pozo, E., Guardiola, F.A., Meseguer, J., Esteban, M.A., Cuesta, A., 2012. Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity in resistant, gilthead seabream, and susceptible, European sea bass, teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 33, 1159-1166.
- Chaves-Pozo, E., Montero, J., Cuesta, A., Tafalla, C., 2010. Viral hemorrhagic septicemia and infectious pancreatic necrosis viruses replicate differently in rainbow trout gonad and induce different chemokine transcription profiles. *Dev Comp Immunol* 34, 648-658.
- Chaves-Pozo, E., Pelegrin, P., Mulero, V., Meseguer, J., Garcia Ayala, A., 2003. A role for acidophilic granulocytes in the testis of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L., *Teleostei*). *J Endocrinol* 179, 165-174.
- Chen, J., Xu, Q., Wang, T., Collet, B., Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Xie, P., Nie, P., Secombes, C.J., Zou, J., 2013. Phylogenetic analysis of vertebrate CXC chemokines reveals novel lineage specific groups in teleost fish. *Dev Comp Immunol* 41, 137-152.
- Chen, K., Cerutti, A., 2011. The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr Opin Immunol* 23, 345-352.
- Chen, Y.M., Su, Y.L., Lin, J.H., Yang, H.L., Chen, T.Y., 2006. Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus. *Fish Shellfish Immunol* 20, 58-71.
- Chettri, J.K., Kuhn, J.A., Jaafar, R.M., Kania, P.W., Moller, O.S., Buchmann, K., 2014. Epidermal response of rainbow trout to *Ichthyobodo necator*: immunohistochemical and gene expression studies indicate a Th1-/Th2-like switch. *J Fish Dis* 37, 771-783.
- Chia, T.J., Wu, Y.C., Chen, J.Y., Chi, S.C., 2010. Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish Shellfish Immunol* 28, 434-439.
- Chilmonczyk, S., 1983. The thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) light and electron microscopic study. *Dev Comp Immunol* 7, 59-68.
- Chilmonczyk, S., Voccia, I., Monge, D., 1995. Pathogenesis of viral haemorrhagic septicemia virus: cellular aspects. *Vet Res* 26, 505-511.
- Christie, K.E., Havarstein, L.S., Djupvik, H.O., Ness, S., Endresen, C., 1988. Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Arch Virol* 103, 167-177.

- Cohen, S., 1976. Cell mediated immunity and the inflammatory system. *Hum Pathol* 7, 249-264.
- Conzelmann, K.K., Cox, J.H., Schneider, L.G., Thiel, H.J., 1990. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 175, 485-489.
- Criscitiello, M.F., Saltis, M., Flajnik, M.F., 2006. An evolutionarily mobile antigen receptor variable region gene: doubly rearranging NAR-TcR genes in sharks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5036-5041.
- Cuesta, A., Angeles Esteban, M., Meseguer, J., 2006. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Mol Immunol* 43, 1275-1285.
- Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2008. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Mol Immunol* 45, 2333-2342.
- Dalmo, R.A., Bogwald, J., 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol* 25, 384-396.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L.A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol* 6, 295-302.
- Dannevig, B.H., Berg, T., 1986. Isolation of pronephros cells which endocytose chemically modified proteins in the rainbow trout. *Dev Comp Immunol* 10, 25-34.
- Das, B.K., Debnath, C., Patnaik, P., Swain, D.K., Kumar, K., Mishra, B.K., 2009. Effect of beta-glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). *Fish Shellfish Immunol* 27, 678-683.
- Dawood, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., 2016. Immune responses and stress resistance in red sea bream, *Pagrus major*, after oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and vitamin C. *Fish Shellfish Immunol* 54, 266-275.
- DeLuca, D., Wilson, M., Warr, G.W., 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur J Immunol* 13, 546-551.
- Dhanasiri, A.K., Fernandes, J.M., Kiron, V., 2012. Glutamine synthetase activity and the expression of three glul paralogues in zebrafish during transport. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 163, 274-284.
- Dhar, A.K., Manna, S.K., Thomas Allnutt, F.C., 2014. Viral vaccines for farmed finfish. *Virus Dis* 25, 1-17.
- Dijkstra, J.M., Somamoto, T., Moore, L., Hordvik, I., Ototake, M., Fischer, U., 2006. Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. *Mol Immunol* 43, 410-419.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, C., Guroy, D., Davies, S.J., 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production--a Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol* 30, 1-16.
- Dixon, B., Shum, B., Adams, E.J., Magor, K.E., Hedrick, R.P., Muir, D.G., Parham, P., 1998. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol Rev* 166, 341-348.

- Dixon, P.F., Feist, S., Kehoe, E., Parry, L., Stone, D.M., Way, K., 1997. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from Atlantic herring *Clupea harengus* from the English Channel. *Dis Aquat Org* 30, 81-89.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Liebscher, R.S., Dacanay, A., Tsoi, S.C., 2003. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev Comp Immunol* 27, 589-601.
- Atalah E., Izquierdo M.S., Rosenlund G., Caballero M.J, Valencia A., Robaina L., 2007. Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 270, 178-185
- Edholm, E.S., Bengten, E., Stafford, J.L., Sahoo, M., Taylor, E.B., Miller, N.W., Wilson, M., 2010. Identification of two IgD<sup>+</sup> B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Immunol* 185, 4082-4094.
- Edholm, E.S., Stafford, J.L., Quiniou, S.M., Waldbieser, G., Miller, N.W., Bengten, E., Wilson, M., 2007. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, CD4-like molecules. *Dev Comp Immunol* 31, 172-187.
- Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R., Lorenzen, N., 2004. Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Gen Virol* 85, 1167-1179.
- El-Boshy, M.E., El-Ashram, A.M., Abdelhamid, F.M., Gadalla, H.A., 2010. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, beta-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 28, 802-808.
- Ellis, A.E., 1977. The leucocytes of fish: a review. *J Fish Biol* 11, 453-491.
- Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25, 827-839.
- Elsayed, E., Faisal, M., Thomas, M., Whelan, G., Batts, W., Winton, J., 2006. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J Fish Dis* 29, 611-619.
- Espenes, A., Press, C.M., Dannevig, B.H., Landsverk, T., 1995. Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 282, 41-48.
- Esteban MA, C.R., 2015. Fish mucosal immunity: skin. In: *Mucosal Health in Aquaculture* (Beck BH, Peatman E, eds), 67–93.
- Falk, K., Press, C.M., Landsverk, T., Dannevig, B.H., 1995. Spleen and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA). *Vet Immunol Immunopathol* 49, 115-126.
- Fänge R, N.S., 1985. The fish spleen: structure and function. *Experientia*, 152-158.
- Fernandez-Trujillo, M.A., Garcia-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Alvarez, M.C., Bejar, J., 2011. Differential antiviral activity of Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from gilthead seabream (*Sparus aurata*) against Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV). *Mol Immunol* 49, 107-114.



- Fernandez-Trujillo, M.A., Garcia-Rosado, E., Alonso, M.C., Castro, D., Alvarez, M.C., Bejar, J., 2013. Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show in vitro antiviral activity against RNA and DNA viruses. *Mol Immunol* 56, 630-636.
- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J.O., Boudinot, P., 2013. The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front Immunol* 4, 28.
- Findly, R.C., Zhao, X., Noe, J., Camus, A.C., Dickerson, H.W., 2013. B cell memory following infection and challenge of channel catfish with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Dev Comp Immunol* 39, 302-311.
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Kollner, B., Ototake, M., Nakanishi, T., 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* 20, 209-226.
- Flajnik, M.F., Kasahara, M., 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* 11, 47-59.
- Follett, J.E., Meyers, T.R., Burton, T.O., Geesin, J.L., 1997. Comparative susceptibilities of salmonid species in Alaska to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and north American viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *J Aquat Animal Health* 9, 34-40.
- Forlenza, M., Fink, I.R., Raes, G., Wiegertjes, G.F., 2011. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev Comp Immunol* 35, 1246-1255.
- Gagne, N., Mackinnon, A.M., Boston, L., Souter, B., Cook-Versloot, M., Griffiths, S., Olivier, G., 2007. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from mummichog, stickleback, striped bass and brown trout in eastern Canada. *J Fish Dis* 30, 213-223.
- Galindo-Villegas, J., Mulero, I., Garcia-Alcazar, A., Munoz, I., Penalver-Mellado, M., Streitenberger, S., Scapigliati, G., Meseguer, J., Mulero, V., 2013. Recombinant TNFalpha as oral vaccine adjuvant protects European sea bass against vibriosis: insights into the role of the CCL25/CCR9 axis. *Fish Shellfish Immunol* 35, 1260-1271.
- Ganassin, R.C., Bols, N.C., 1998. Development of a monocyte/macrophage-like cell line, RTS11, from rainbow trout spleen. *Fish Shellfish Immunol* 8, 457-476.
- Glimcher, L.H., Murphy, K.M., 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 14, 1693-1711.
- Gomez, D., Sunyer, J.O., Salinas, I., 2013. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 35, 1729-1739.
- Granja, A.G., Leal, E., Pignatelli, J., Castro, R., Abos, B., Kato, G., Fischer, U., Tafalla, C., 2015. Identification of teleost skin CD8alpha<sup>+</sup> dendritic-like cells, representing a potential common ancestor for mammalian cross-presenting dendritic cells. *J Immunol* 195, 1825-1837.
- Grassi Milano, E., Basari, F., Chimenti, C., 1997. Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *Gen Comp Endocrinol* 108, 483-496.
- Grayfer, L., Belosevic, M., 2009. Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma. *Dev Comp Immunol* 33, 235-246.

- Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, O., 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunopathol* 72, 203-212.
- Guliyeva, U., Oner, F., Ozsoy, S., Haziroglu, R., 2006. Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system. *Eur J Pharm Biopharm* 62, 17-25.
- Hamilton, S.J., 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* 326, 1-31.
- Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6919-6924.
- Hansen, J.D., Strassburger, P., 2000. Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 alpha, in rainbow trout. *J Immunol* 164, 3132-3139.
- Hardie, L.J., Laing, K.J., Daniels, G.D., Grabowski, P.S., Cunningham, C., Secombes, C.J., 1998. Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine* 10, 555-563.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2011. Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. *Fish Shellfish Immunol* 30, 972-979.
- Harmache, A., LeBerre, M., Droineau, S., Giovannini, M., Bremont, M., 2006. Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *J Virol* 80, 3655-3659.
- Harms, C.A., Kennedy-Stoskopf, S., Horne, W.A., Fuller, F.J., Tompkins, W.A., 2000. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 10, 61-85.
- Hatten, F., Fredriksen, A., Hordvik, I., Endresen, C., 2001. Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish Shellfish Immunol* 11, 257-268.
- Haugarvoll, E., Bjerkas, I., Nowak, B.F., Hordvik, I., Koppang, E.O., 2008. Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *J Anat* 213, 202-209.
- Haugland, G.T., Jordal, A.E., Wergeland, H.I., 2012. Characterization of small, mononuclear blood cells from salmon having high phagocytic capacity and ability to differentiate into dendritic like cells. *PLoS One* 7, e49260.
- Heidarieh, M., Mirvaghefi, A.R., Akbari, M., Farahmand, H., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A.A., Behgar, M., 2012. Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 38, 1169-1174.
- Henry, K.M., Loynes, C.A., Whyte, M.K., Renshaw, S.A., 2013. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. *J Leukoc Biol* 94, 633-642.
- Hill, D.J., Rowley, A.F., 1998. Are integrins involved in the aggregatory and phagocytic behaviour of fish haemostatic cells? *J Exp Biol* 201, 599-608.

- Huising, M.O., Stet, R.J., Kruiswijk, C.P., Savelkoul, H.F., Lidy Verburg-van Kemenade, B.M., 2003. Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS. *Trends Immunol* 24, 307-313.
- Huising, M.O., Stet, R.J., Savelkoul, H.F., Verburg-van Kemenade, B.M., 2004. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev Comp Immunol* 28, 395-413.
- Huttenhuis, H.B., Ribeiro, A.S., Bowden, T.J., Van Bavel, C., Taverne-Thiele, A.J., Rombout, J.H., 2006. The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol* 21, 261-271.
- Ibiyo, L.M., Madu, C.T., Eze, S.S., 2006. Effects of vitamin C supplementation on the growth of *Heterobranchius longifilis* fingerlings. *Arch Anim Nutr* 60, 325-332.
- Inoue, Y., Kamota, S., Ito, K., Yoshiura, Y., Ototake, M., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2005. Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-10 cDNAs. *Fish Shellfish Immunol* 18, 335-344.
- Inouye, K., Ikeya, F., Yamazaki, T., Hara, T., 1990. Studies on the method for evaluating virucidal activities of germicides to IPNV and IHNV. *Fish Pathology* 2, 69-79.
- Irwin, M.J., Kaatari, S.L., 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet Immunol Immunopathol* 12, 39-45.
- Jensen, M.H., 1965. Research on the virus of Egtved disease. *Ann N Y Acad Sci* 126, 422-426.
- Jeong, Y.J., Hong, S.W., Kim, J.H., Jin, D.H., Kang, J.S., Lee, W.J., Hwang, Y.I., 2011. Vitamin C-treated murine bone marrow-derived dendritic cells preferentially drive naive T cells into Th1 cells by increased IL-12 secretions. *Cell Immunol* 266, 192-199.
- Johansson, P., Corripio-Miyar, Y., Wang, T., Collet, B., Secombes, C.J., Zou, J., 2012. Characterisation and expression analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologue of the human dendritic cell marker CD208/lysosomal associated membrane protein 3. *Dev Comp Immunol* 37, 402-413.
- Joosten, P.H., Engelsma, M.Y., van der Zee, M.D., Rombout, J.H., 1997. Induction of oral tolerance in carp (*Cyprinus carpio* L.) after feeding protein antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 60, 187-196.
- Jorgensen, J.B., Johansen, A., Hegseth, M.N., Zou, J., Robertsen, B., Collet, B., Secombes, C.J., 2007. A recombinant CHSE-214 cell line expressing an Mx1 promoter-reporter system responds to both interferon type I and type II from salmonids and represents a versatile tool to study the IFN-system in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 23, 1294-1303.
- Jorgensen, T.R., Raida, M.K., Kania, P.W., Buchmann, K., 2009. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in skin and fin tissue during infection with a variant of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: *Gyrodactylidae*). *Folia Parasitol (Praha)* 56, 251-258.
- Kaattari, S., 1992. Fish B lymphocytes: defining their form and function. *Ann Rev Fish Dis* 2, 161-180.
- Kato, G., Kondo, H., Aoki, T., Hirono, I., 2012. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against *Nocardia seriolae*. *Fish Shellfish Immunol* 33, 243-250.
- Kee, B.L., Rivera, R.R., Murre, C., 2001. Id3 inhibits B lymphocyte progenitor growth and survival in response to TGF-beta. *Nat Immunol* 2, 242-247.

- Kelly, A., Houston, S.A., Sherwood, E., Casulli, J., Travis, M.A., 2017a. Regulation of innate and adaptive immunity by TGFbeta. *Adv Immunol* 134, 137-233.
- Kelly, C., Takizawa, F., Sunyer, J.O., Salinas, I., 2017b. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) secretory component binds to commensal bacteria and pathogens. *Sci Rep* 7, 41753.
- Ketola, H.G., 1979. Influence of dietary zinc on cataracts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Nutr* 109, 965-969.
- Kibenge, F.S., Godoy, M.G., Wang, Y., Kibenge, M.J., Gherardelli, V., Mansilla, S., Lisperger, A., Jarpa, M., Larroquete, G., Avendano, F., Lara, M., Gallardo, A., 2009. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. *Virol J* 6, 88.
- Kinoshita, S., Biswas, G., Kono, T., Hikima, J., Sakai, M., 2013. Presence of two tumor necrosis factor (tnf)-alpha homologs on different chromosomes of zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*). *Mar Genomics* 13,1-9.
- Kleinewietfeld, M., Hafler, D.A., 2013. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* 25,305-312.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., Nusslein-Volhard, C., 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421, 279-282.
- Kohli, G., Hu, S., Clelland, E., Di Muccio, T., Rothenstein, J., Peng, C., 2003. Cloning of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF-beta 1 in oocyte maturation. *Endocrinology* 144, 1931-1941.
- Kollner, B., Fischer, U., Rombout, J.H., Taverne-Thiele, J.J., Hansen, J.D., 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Dev Comp Immunol* 28, 1049-1062.
- Koppang, E.O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M.A., Dijkstra, J.M., Kollner, B., Aune, L., Jirillo, E., Hordvik, I., 2010. Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *J Anat* 217, 728-739.
- Korytar, T., Jaros, J., Verleih, M., Rebl, A., Kotterba, G., Kuhn, C., Goldammer, T., Kollner, B., 2013. Novel insights into the peritoneal inflammation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 35, 1192-1199.
- Kudrenko, B., Snape, N., Barnes, A.C., 2009. Linear and branched beta(1-3) D-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: implications for dietary immunostimulation. *Fish Shellfish Immunol* 26, 443-450.
- Kuhlwein, H., Emery, M.J., Rawling, M.D., Harper, G.M., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2013. Effects of a dietary beta-(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Appl Microbiol* 115, 1091-1106.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., 2005. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Mol Cell Biochem* 280, 25-33.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., 2006. Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Dis Aquat Organ* 70, 63-70.

- Laing, K.J., Hansen, J.D., 2011. Fish T cells: recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol* 35, 1282-1295.
- Laing, K.J., Secombes, C.J., 2004a. Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28, 443-460.
- Laing, K.J., Secombes, C.J., 2004b. Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. *Mol Immunol* 41, 793-808.
- Laing, K.J., Zou, J.J., Purcell, M.K., Phillips, R., Secombes, C.J., Hansen, J.D., 2006. Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *J Immunol* 177, 3939-3951.
- Lanes, C.F., Bolla, S., Fernandes, J.M., Nicolaisen, O., Kiron, V., Babiak, I., 2012. Nucleotide enrichment of live feed: a promising protocol for rearing of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Mar Biotechnol* (NY) 14, 544-558.
- Larsen, R., Rokenes, T.P., Robertsen, B., 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol* 78, 7938-7944.
- Leong, J.C., Anderson, E., Bootland, L.M., Chiou, P.W., Johnson, M., Kim, C., Mourich, D., Trobridge, G., 1997. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Dev Biol Stand* 90, 267-277.
- Levrud, J.P., Boudinot, P., Colin, I., Benmansour, A., Peyrieras, N., Herbolme, P., Lutfalla, G., 2007. Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *J Immunol* 178, 4385-4394.
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., Lapatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* 7, 1116-1124.
- Li, J.H., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Wen, Y., 2007. Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Mol Immunol* 44, 2078-2086.
- Li, M.O., Flavell, R.A., 2006. TGF-beta, T-cell tolerance and immunotherapy of autoimmune diseases and cancer. *Expert Rev Clin Immunol* 2, 257-265.
- Lieberman, J., 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-370.
- Lieschke, G.J., Oates, A.C., Crowhurst, M.O., Ward, A.C., Layton, J.E., 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98, 3087-3096.
- Lin, A.J., Slack, N.L., Ahmad, A., Koltover, I., George, C.X., Samuel, C.E., Safinya, C.R., 2000. Structure and structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes. *J Drug Target* 8, 13-27.
- Lin, J.H., Yu, C.C., Lin, C.C., Yang, H.L., 2005. An oral delivery system for recombinant subunit vaccine to fish. *Dev Biol (Basel)* 121, 175-180.
- Lin, M.F., Shiau, S.Y., 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 244 215-221.
- Ling, S.H., Wang, X.H., Xie, L., Lim, T.M., Leung, K.Y., 2000. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathway of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology* 146, 7-19.

- Liu, L., Fujiki, K., Dixon, B., Sundick, R.S., 2002. Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNF decoy receptor using cDNA fragments containing AU-rich elements. *Cytokine* 17, 71-81.
- Liu, Y., Chui, L., Feng, L., Jiang, J., Jiang, W.D., Hu, K., Li, S.H., Zhou, X.Q., 2011. Effects of graded levels of dietary vitamin C on the growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aqua Res* 42, 534-548.
- Lobb, C.J., Olson, M.O.J., Clem, L.W., 1984. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. *J Immunol* 132, 1917-1923.
- Lokesh, J., Fernandes, J.M., Korsnes, K., Bergh, O., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2012. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or beta-glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol* 33, 626-631.
- Lopez-Munoz, A., Roca, F.J., Meseguer, J., Mulero, V., 2009. New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities. *J Immunol* 182, 3440-3449.
- Lopez-Munoz, A., Roca, F.J., Sepulcre, M.P., Meseguer, J., Mulero, V., 2010. Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus. *Dev Comp Immunol* 34, 546-552.
- Lorenzen, N., LaPatra, S.E., 1999. Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response. *Fish Shellfish Immunol* 9, 345-360.
- Lovy, J., Savidant, G.P., Speare, D.J., Wright, G.M., 2009. Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids. *Fish Shellfish Immunol* 27, 365-368.
- Lovy, J., Wright, G.M., Speare, D.J., 2006. Morphological presentation of a dendritic-like cell within the gills of chinook salmon infected with *Loma salmonae*. *Dev Comp Immunol* 30, 259-263.
- Lugo-Villarino, G., Balla, K.M., Stachura, D.L., Banuelos, K., Werneck, M.B., Traver, D., 2010. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15850-15855.
- Lunden, T., Bylund, G., 2002. Effect of sulphadiazine and trimethoprim on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol* 85(1-2), 99-108.
- Lutfalla, G., Crollius, H.R., Stange-Thomann, N., Jaillon, O., Mogensen, K., Monneron, D., 2003. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 4, 29.
- Maddocks, C.E., Nolan, E.T., Feist, S.W., Crumlish, M., Richards, R.H., Williams, C.F., 2015. Puffy skin disease (PSD) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a case definition. *J Fish Dis* 38, 653-664.
- Magnadottir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol (NY)* 12, 361-379.
- Maki, J.L., Dickerson, H.W., 2003. Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 876-881.

- Maloy, K.J., Burkhart, C., Junt, T.M., Odermatt, B., Oxenius, A., Piali, L., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., 2000. CD4(+) T cell subsets during virus infection. Protective capacity depends on effector cytokine secretion and on migratory capability. *J Exp Med* 191, 2159-2170.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Marsden, M.J., Vaughan, L.M., Foster, T.J., Secombes, C.J., 1996. A live (*delta aroA*) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infect Immun* 64, 3863-3869.
- Martin, S.A., Mohanty, B.P., Cash, P., Houlihan, D.F., Secombes, C.J., 2007. Proteome analysis of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) cell line SHK-1 following recombinant IFN-gamma stimulation. *Proteomics* 7, 2275-2286.
- McLoughlin, M.F., Graham, D.A., 2007. Alphavirus infections in salmonids--a review. *J Fish Dis* 30, 511-531.
- Meier, W., Schmitt, M., Wahli, T., 1994. Viral haemorrhagic septicemia (VHS) of nonsalmonids. *Ann Rev Fish Dis* 4, 359-373.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Garcia-Ayala, A., Lopez-Ruiz, A., 1992. Ultrastructural study of the phagocytotic mechanism in blood thrombocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Electron Microsc* 3, 589-590.
- Mihajlovic, M., Lazaridis, T., 2010. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochim Biophys Acta* 1798, 1485-1493.
- Milstein, O., Hagin, D., Lask, A., Reich-Zeliger, S., Shezen, E., Ophir, E., Eidelstein, Y., Afik, R., Antebi, Y.E., Dustin, M.L., Reisner, Y., 2011. CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. *Blood* 117, 1042-1052.
- Mjaaland, S., Rimstad, E., Falk, K., Dannevig, B.H., 1997. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J Virol* 71, 7681-7686.
- Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K., 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25, 1101-1104.
- Montero, J., Coll, J., Sevilla, N., Cuesta, A., Bols, N.C., Tafalla, C., 2008. Interleukin 8 and CK-6 chemokines specifically attract rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS11 monocyte-macrophage cells and have variable effects on their immune functions. *Dev Comp Immunol* 32, 1374-1384.
- Montero, J., Garcia, J., Ordas, M.C., Casanova, I., Gonzalez, A., Villena, A., Coll, J., Tafalla, C., 2011a. Specific regulation of the chemokine response to viral hemorrhagic septicemia virus at the entry site. *J Virol* 85, 4046-4056.
- Montero, J., Ordas, M.C., Alejo, A., Gonzalez-Torres, L., Sevilla, N., Tafalla, C., 2011b. CK12, a rainbow trout chemokine with lymphocyte chemo-attractant capacity associated to mucosal tissues. *Mol Immunol* 48, 1102-1113.
- Moore, L.J., Dijkstra, J.M., Koppang, E.O., Hordvik, I., 2009. CD4 homologues in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol* 26, 10-18.

- Moore, L.J., Somamoto, T., Lie, K.K., Dijkstra, J.M., Hordvik, I., 2005. Characterisation of salmon and trout CD8alpha and CD8beta. *Mol Immunol* 42, 1225-1234.
- Mortensen, H.F., Heuer, O.E., Lorenzen, N., Otte, L., Olesen, N.J., 1999. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res* 63, 95-106.
- Mulcahy, D., Pascho, R.J., 1984. Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish viruses. *Science* 225, 333-335.
- Mulero, V., Esteban, M.A., Meseguer, J., 1998. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 66, 185-199.
- Nam, B.H., Hirono, I., Aoki, T., 2003. The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR alpha-, beta-, gamma-, and delta-chains. *J Immunol* 170, 3081-3090.
- Nam, B.H., Moon, J.Y., Kim, Y.O., Kong, H.J., Kim, W.J., Lee, S.J., Kim, K.K., 2010. Multiple beta-defensin isoforms identified in early developmental stages of the teleost *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol* 28, 267-274.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017-1024.
- Nelson, J.S., Rohovec, J.S., Fryer, J.L., 1985. Tissue location of vibrio bacterin delivered by intraperitoneal injection, immersion and oral routes to *Salmo gairdneri*. *Fish Pathol.* 19, 263-269.
- Neukirch, M., 1986. Demonstration of persistent viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus in rainbow trout after experimental waterborne infection. *J Vet Med* 33, 471-476.
- Nigam, A.K., Srivastava, N., Rai, A.K., Kumari, U., Mittal, A.K., Mittal, S., 2014. The first evidence of cholinesterases in skin mucus of carps and its applicability as biomarker of organophosphate exposure. *Environ Toxicol* 29, 788-796.
- Nomiyama, H., Hieshima, K., Osada, N., Kato-Unoki, Y., Otsuka-Ono, K., Takegawa, S., Izawa, T., Yoshizawa, A., Kikuchi, Y., Tanase, S., Miura, R., Kusuda, J., Nakao, M., Yoshie, O., 2008. Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics* 9, 222.
- Ohtani, M., Hayashi, N., Hashimoto, K., Nakanishi, T., Dijkstra, J.M., 2008. Comprehensive clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish. *Immunogenetics* 60, 383-397.
- Oidtmann, B., Lapatra, S.E., Verner-Jeffreys, D., Pond, M., Peeler, E.J., Noguera, P.A., Bruno, D.W., St-Hilaire, S., Schubiger, C.B., Snekvik, K., Crumlish, M., Green, D.M., Metselaar, M., Rodger, H., Schmidt-Posthaus, H., Galeotti, M., Feist, S.W., 2013. Differential characterization of emerging skin diseases of rainbow trout--a standardized approach to capturing disease characteristics and development of case definitions. *J Fish Dis* 36, 921-937.
- Olesen, N., J., Lorenzen, N., Vestergaard-Jorgensen, P.E., 1991. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT. *Dis Aquat Org* 10, 31-38.



- Olesen, N.J., 1986. Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions. *Dis Aquat Org* 1, 183-186.
- Olesen, N.J., Vestergaard-Jorgensen, P.E., 1986. Detection of neutralizing antibody to Egtved virus in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by plaque neutralization test with complement addition. *J Appl Ichthyol* 2, 33-41.
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J Fish Dis* 35, 83-108.
- Ordas, M.C., Cuesta, A., Mercado, L., Bols, N.C., Tafalla, C., 2011. Viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) up-regulates the cytotoxic activity and the perforin/granzyme pathway in the rainbow trout RTS11 cell line. *Fish Shellfish Immunol* 31, 252-259.
- Ortuno, J., Cuesta, A., Angeles Esteban, M., Meseguer, J., 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 79, 167-180.
- Parker, A., Cuddihy, S.L., Son, T.G., Vissers, M.C., Winterbourn, C.C., 2011. Roles of superoxide and myeloperoxidase in ascorbate oxidation in stimulated neutrophils and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HL60 cells. *Free Radic Biol Med* 51, 1399-1405.
- Patel, S., Overgard, A.C., Nerland, A.H., 2008. CD8alpha and CD8beta in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: cloning, characterization and gene expression during viral and bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol* 25, 570-580.
- Patel, S., Overgard, A.C., Nerland, A.H., 2009. A CD4 homologue in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): molecular cloning and characterisation. *Fish Shellfish Immunol* 26, 377-384.
- Paul, Z.J., 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol.* , 225-235.
- Peatman, E., Liu, Z., 2007. Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics* 59, 613-623.
- Peeler, E.J., Ryder, D., Thrush, M.A., Mewett, J., Hulland, J., Feist, S.W., 2014. Acute dermatitis in farmed trout: an emerging disease. *J Fish Dis* 37, 1021-1029.
- Peng, Y., Kwok, K.H., Yang, P.H., Ng, S.S., Liu, J., Wong, O.G., He, M.L., Kung, H.F., Lin, M.C., 2005. Ascorbic acid inhibits ROS production, NF-kappa B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly. *Neuropharmacology* 48, 426-434.
- Perlin, J.R., Talbot, W.S., 2007. Signals on the move: chemokine receptors and organogenesis in zebrafish. *Sci STKE* 2007, pe45.
- Pignatelli, J., Castro, R., Gonzalez Granja, A., Abos, B., Gonzalez, L., Jensen, L.B., Tafalla, C., 2014. Immunological characterization of the teleost adipose tissue and its modulation in response to viral infection and fat-content in the diet. *PLoS One* 9, e110920.
- Pijanowski, L., Golbach, L., Kolaczowska, E., Scheer, M., Verburg-van Kemenade, B.M., Chadzinska, M., 2013. Carp neutrophilic granulocytes form extracellular traps via ROS-dependent and independent pathways. *Fish Shellfish Immunol* 34, 1244-1252.
- Pinto, R.D., Nascimento, D.S., Reis, M.I., do Vale, A., Dos Santos, N.M., 2007. Molecular characterization, 3D modelling and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-10. *Mol Immunol* 44, 2056-2065.

- Pinto, R.D., Nascimento, D.S., Vale, A., Santos, N.M., 2006. Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) CD8alpha. *Vet Immunol Immunopathol* 110, 169-177.
- Potter, M., Bernstein, A., Lee, J.M., 1998. The wst gene regulates multiple forms of thymocyte apoptosis. *Cell Immunol* 188, 111-117.
- Press, C.M., Lillehaug, A., 1995. Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. *Br Vet J* 151, 45-69.
- Press, C.M.L., Dannevig, B.H., Landsverk, T., 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol* 4, 79-93.
- Prinz, W., Bortz, R., Bregin, B., Hersch, M., 1977. The effect of ascorbic acid supplementation on some parameters of the human immunological defence system. *Int J Vitam Nutr Res* 47, 248-257.
- Rajanbabu, V., Chen, J.Y., 2011. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides* 32, 415-420.
- Ramirez-Gomez, F., Greene, W., Rego, K., Hansen, J.D., Costa, G., Kataria, P., Bromage, E.S., 2012. Discovery and characterization of secretory IgD in rainbow trout: secretory IgD is produced through a novel splicing mechanism. *J Immunol* 188, 1341-1349.
- Rayman, M.P., 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233-241.
- Razquin, B.E., Castillo, A., Lopez-Fierro, P., Alvarez, F., Zapata, A., Villena, A.J., 1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. *J Fish Biol* 36, 159-173.
- Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H.M., 2010. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet Immunol Immunopathol* 134, 139-150.
- Reed, L.J., Muench, A., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Epidemiol.* 27, 493-497.
- Ren, T., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Micheal, F.R., Uyan, O., Tung, H.T., 2007. Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 267, 31-37.
- Reno, P.W., 1999. Infectious pancreatic necrosis virus and associated aquatic birnaviruses. In: *Fish Diseases and Disorders Vol. 3: viral, bacterial and fungal infections* Ed. P.T. Woo and D.W. Bruno, 1-55.
- Reyes-Cerpa, S., Reyes-Lopez, F., Toro-Ascuy, D., Montero, R., Maisey, K., Acuna-Castillo, C., Sunyer, J.O., Parra, D., Sandino, A.M., Imarai, M., 2014. Induction of anti-inflammatory cytokine expression by IPNV in persistent infection. *Fish Shellfish Immunol* 41, 172-182.
- Reyes-Cerpa, S., Reyes-Lopez, F.E., Toro-Ascuy, D., Ibanez, J., Maisey, K., Sandino, A.M., Imarai, M., 2012. IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence. *Fish Shellfish Immunol* 32, 291-300.
- Robertsen, B., Bergan, V., Rokenes, T., Larsen, R., Albuquerque, A., 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J Interferon Cytokine Res* 23, 601-612.

- Roca, F.J., Mulero, I., Lopez-Munoz, A., Sepulcre, M.P., Renshaw, S.A., Meseguer, J., Mulero, V., 2008. Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *J Immunol* 181, 5071-5081.
- Rodrigues, P.N., Vazquez-Dorado, S., Neves, J.V., Wilson, J.M., 2006. Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev Comp Immunol* 30, 1156-1167.
- Rodriguez, A., Cuesta, A., Ortuno, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol* 96, 183-192.
- Rodriguez, S., Vilas, P., Perez, S., 1993. A viral diagnostic survey of spanish rainbow trout farms: I Sensitivity of four cell lines to wild IPNV isolates. *Bull EAFP* 13, 119-122.
- Rodriguez Saint-Jean, S., Borrego, J.J., Perez-Prieto, S.I., 2003. Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Adv Virus Res* 62, 113-165.
- Romalde, J.L., Luzardo-Alvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A., Blanco-Wendenz, J., 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture* 236, 119-129.
- Romano, N., Caccia, E., Piergentili, R., Rossi, F., Ficca, A.G., Ceccariglia, S., Mastrolia, L., 2011. Antigen-dependent T lymphocytes (TcRbeta<sup>+</sup>) are primarily differentiated in the thymus rather than in other lymphoid tissues in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish Shellfish Immunol* 30, 773-782.
- Rombout, J.H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., Kiron, V., 2011. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol* 31, 616-626.
- Rombout, J.H., Joosten, P.H., Engelsma, M.Y., Vos, A.P., Taverne, N., Taverne-Thiele, J.J., 1998. Indications for a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol* 22, 63-77.
- Rombout, J.H., Taverne, N., van de Kamp, M., Taverne-Thiele, A.J., 1993. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol* 17, 309-317.
- Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Hoseinifar, S.H., 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry. *Fish Physiol Biochem* 40, 1601-1607.
- Rowley, A.F., 1996. The evolution of inflammatory mediators. *Mediators Inflamm* 5, 3-13.
- Salinas, I., 2015. The mucosal immune system of teleost fish. *Biology (Basel)* 4, 525-539.
- Salinas, I., Anderson, S.A., Wright, J., Webb, V.L., 2012. *In vivo* innate immune responses of groper (*Polyprion oxygeneios*) against *Miamiensis avidus* infection and lack of protection following dietary vitamin C administration. *Fish Shellfish Immunol* 32, 8-15.
- Salinas, I., LaPatra, S.E., Erhardt, E.B., 2015. Nasal vaccination of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis and enteric red mouth disease. *Dev Comp Immunol* 53, 105-111.
- Salinas, I., Zhang, Y.A., Sunyer, J.O., 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol* 35, 1346-1365.
- Sargent, J.R., Tacon, A.G., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc Nutr Soc* 58, 377-383.

- Savan, R., Igawa, D., Sakai, M., 2003. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, *Cyprinus carpio* L. Eur J Biochem 270, 4647-4654.
- Scapigliati, G., Romano, N., Abelli, L., Meloni, S., Ficca, A.G., Buonocore, F., Bird, S., Secombes, C.J., 2000. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish Shellfish Immunol 10, 329-341.
- Schwager, J., Bompard, A., Weber, P., Raederstorff, D., 2015. Ascorbic acid modulates cell migration in differentiated HL-60 cells and peripheral blood leukocytes. Mol Nutr Food Res 59, 1513-1523.
- Sebastien A. Rider, S.J.D., Awadhesh N. Jha, Andrew A. Fisher, Jan Knight, John W. Sweetman, 2009. Supra-nutritional dietary intake of selenite and selenium yeast in normal and stressed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications on selenium status and health responses. Aquaculture 295, 282-291.
- Secombes, C.J., Wang, T., Bird, S., 2011. The interleukins of fish. Dev Comp Immunol 35, 1336-1345.
- Secombes, C.J., Zou, J., 2017. Evolution of Interferons and Interferon Receptors. Front Immunol 8, 209.
- Seppola, M., Larsen, A.N., Steiro, K., Robertsen, B., Jensen, I., 2008. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1beta, IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Mol Immunol 45, 887-897.
- Sepulcre, M.P., Alcaraz-Perez, F., Lopez-Munoz, A., Roca, F.J., Meseguer, J., Cayuela, M.L., Mulero, V., 2009. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. J Immunol 182, 1836-1845.
- Serezl, R., 2005. The effect of oxytetracycline on non-specific immune response in sea bream (*Sparus aurata* L. 1758) Turk J Vet Anim Sci 29, 31-35.
- Sever, L., Vo, N.T., Bols, N.C., Dixon, B., 2014. Expression of tapasin in rainbow trout tissues and cell lines and up regulation in a monocyte/macrophage cell line (RTS11) by a viral mimic and viral infection. Dev Comp Immunol 44, 86-93.
- Sharma, P., Raghavan, S.A., Saini, R., Dikshit, M., 2004. Ascorbate-mediated enhancement of reactive oxygen species generation from polymorphonuclear leukocytes: modulatory effect of nitric oxide. J Leukoc Biol 75, 1070-1078.
- Skall, H.F., Slierendrecht, W.J., King, J.A., Olesen, N.J., 2004. Experimental infection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral haemorrhagic septicaemia virus isolates from European marine and farmed fishes. Dis Aquat Org 58, 99-110.
- Snow, M., Bain, N., Black, J., Taupin, V., Cunningham, C.O., King, J.A., Skall, H.F., Raynard, R.S., 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). Dis Aquat Org 61, 11-21.
- Somamoto, T., Yoshiura, Y., Sato, A., Nakao, M., Nakanishi, T., Okamoto, N., Ototake, M., 2006. Expression profiles of TCRbeta and CD8alpha mRNA correlate with virus-specific cell-mediated cytotoxic activity in ginbuna crucian carp. Virology 348, 370-377.
- Song, R., Wei, R.B., Luo, H.Y., Wang, D.F., 2012. Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). Molecules 17, 2980-2991.

- Stacheli, P., 1990. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res* 38, 147-200.
- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A.G., Zheng, M., Brown, G.D., Gordon, S., Shellito, J.E., Kolls, J.K., 2003. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med* 198, 1677-1688.
- Stosik, M., Deptula, W., Travnicek, M., Baldy-Chudzik, K., 2002. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*). *Vet Med* 40, 21-25.
- Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S., 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192.
- Strobl, H., Knapp, W., 1999. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1(15), 1283-90.
- Suetake, H., Araki, K., Akatsu, K., Somamoto, T., Dijkstra, J.M., Yoshiura, Y., Kikuchi, K., Suzuki, Y., 2007. Genomic organization and expression of CD8alpha and CD8beta genes in fugu *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol* 23, 1107-1118.
- Sun, X.F., Shang, N., Hu, W., Wang, Y.P., Guo, Q.L., 2007. Molecular cloning and characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) CD8beta and CD4-like genes. *Fish Shellfish Immunol* 23, 1242-1255.
- Tacchi, L., Musharrafieh, R., Larragoite, E.T., Crossey, K., Erhardt, E.B., Martin, S.A., LaPatra, S.E., Salinas, I., 2014. Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nat Commun* 5, 5205.
- Tafalla, C., Aranguren, R., Secombes, C.J., Castrillo, J.L., Novoa, B., Figueras, A., 2003. Molecular characterisation of sea bream (*Sparus aurata*) transforming growth factor beta1. *Fish Shellfish Immunol* 14, 405-421.
- Tafalla, C., Aranguren, R., Secombes, C.J., Figueras, A., Novoa, B., 2004. Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol* 16, 11-24.
- Tafalla, C., Gonzalez, L., Castro, R., Granja, A.G., 2017. B cell-activating factor regulates different aspects of B cell functionality and is produced by a subset of splenic B cells in teleost fish. *Front Immunol* 8, 295.
- Tafalla, C., Leal, E., Yamaguchi, T., Fischer, U., 2016. T cell immunity in the teleost digestive tract. *Dev Comp Immunol* 64, 167-177.
- Takizawa, F., Araki, K., Ohtani, M., Toda, H., Saito, Y., Lampe, V.S., Dijkstra, J.M., Ototake, M., Moritomo, T., Nakanishi, T., Fischer, U., 2014. Transcription analysis of two Eomesodermin genes in lymphocyte subsets of two teleost species. *Fish Shellfish Immunol* 36, 215-222.
- Takizawa, F., Dijkstra, J.M., Kotterba, P., Korytar, T., Kock, H., Kollner, B., Jaureguierry, B., Nakanishi, T., Fischer, U., 2011a. The expression of CD8alpha discriminates distinct T cell subsets in teleost fish. *Dev Comp Immunol* 35, 752-763.
- Takizawa, F., Koppang, E.O., Ohtani, M., Nakanishi, T., Hashimoto, K., Fischer, U., Dijkstra, J.M., 2011b. Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Mol Immunol* 48, 1360-1368.

- Tatner, M.F., Manning, M.J., 1983. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev Comp Immunol* 7, 69-75.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2006. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (*Characidae*, *Bryconinae*). *J Submicrosc Cytol Pathol* 38, 209-215.
- Tewary, A., Patra, B.C., 2008. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Physiol Biochem* 34, 251-259.
- Thoulouze, M.I., Bouguyon, E., Carpentier, C., Bremont, M., 2004. Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol* 78, 4098-4107.
- Tian, J., Yu, J., Sun, X., 2008a. Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunisation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vet Immunol Immunopathol* 126, 220-229.
- Tian, J.Y., Sun, X.Q., Chen, X.G., 2008b. Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus (LCDV) to Japanese flounder. *Fish Shellfish Immunol* 24, 592-599.
- Trobridge, G.D., Chiou, P.P., Leong, J.C., 1997. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J Virol* 71, 5304-5311.
- Valero, Y., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J., Esteban, M.A., Cuesta, A., 2013. Biological role of fish antimicrobial peptides. In: *Antimicrobial peptides: properties, functions and role in immune response*. Seong MD, Hak YI, eds., 31-60.
- Vandenberg, G.W., 2004. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? *Anim Health Res Rev* 5, 301-304.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510.
- Wahli, T., Meier, W., Pfister, K., 1986. Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in Ichthyophthirius multifiliis infected rainbow-trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Trop* 43, 287-289.
- Walport, M.J., 2001a. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058-1066.
- Walport, M.J., 2001b. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344, 1140-1144.
- Wan, Y.Y., Flavell, R.A., 2009. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 1, 20-36.
- Wang, T., Bird, S., Koussounadis, A., Holland, J.W., Carrington, A., Zou, J., Secombes, C.J., 2009. Identification of a novel IL-1 cytokine family member in teleost fish. *J Immunol* 183, 962-974.
- Wang, W.L., Hong, J.R., Lin, G.H., Liu, W., Gong, H.Y., Lu, M.W., Lin, C.C., Wu, J.L., 2011. Stage-specific expression of TNF $\alpha$  regulates bad/bid-mediated apoptosis and RIP1/ROS-mediated secondary necrosis in Birnavirus-infected fish cells. *PLoS One* 6, e16740.
- Ware, C.F., 2003. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 181-184.
- Warr, G.W., De Luca, D., Griffin, B.R., 1979. Membrane immunoglobulin is present on thymic and splenic lymphocytes of the trout *Salmo gairdneri*. *J Immunol* 123, 910-917.

- Wen, Y., Fang, W., Xiang, L.X., Pan, R.L., Shao, J.Z., 2011. Identification of Treg-like cells in Tetraodon: insight into the origin of regulatory T subsets during early vertebrate evolution. *Cell Mol Life Sci* 68, 2615-2626.
- Wilson, M., Bengten, E., Miller, N.W., Clem, L.W., Du Pasquier, L., Warr, G.W., 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4593-4597.
- Wolf, K., 1988. Viral hemorrhagic septicemia. In: *Fish Viruses and Fish Viral Diseases* Ithaca, NY: Cornell University Press, 217-249.
- Wolf, K., Quimby, M.C., 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* 135, 1065-1066.
- Wolf, K., Quimby, M.C., 1971. Salmonid viruses: infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of first European isolations. *Arch Gesamte Virusforsch* 34, 144-156.
- Wong, G., Kaattari, S.L., Christensen, J.M., 1992. Effectiveness of an oral enteric coated vibrio vaccine for use in salmonid fish. *Immunol Invest* 21, 353-364.
- Xu, C., Guo, T.C., Mutoloki, S., Haugland, O., Marjara, I.S., Evensen, O., 2010. Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication *in vitro*. *J Virol* 84, 8903-8912.
- Xu, H.J., Jiang, W.D., Feng, L., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., 2016a. Dietary vitamin C deficiency depresses the growth, head kidney and spleen immunity and structural integrity by regulating NF-kappaB, TOR, Nrf2, apoptosis and MLCK signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol* 52, 111-138.
- Xu, Z., Parra, D., Gomez, D., Salinas, I., Zhang, Y.A., von Gersdorff Jorgensen, L., Heinecke, R.D., Buchmann, K., LaPatra, S., Sunyer, J.O., 2013. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13097-13102.
- Xu, Z., Takizawa, F., Parra, D., Gomez, D., von Gersdorff Jorgensen, L., LaPatra, S.E., Sunyer, J.O., 2016b. Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. *Nat Commun* 7, 10728.
- Yang, M., Zhou, H., 2008. Grass carp transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1): molecular cloning, tissue distribution and immunobiological activity in teleost peripheral blood lymphocytes. *Mol Immunol* 45, 1792-1798.
- Ye, J., Kaattari, I., Kaattari, S., 2011. Plasmablasts and plasma cells: reconsidering teleost immune system organization. *Dev Comp Immunol* 35, 1273-1281.
- Yoon, S., Mitra, S., Wyse, C., Alnabulsi, A., Zou, J., Weerdenburg, E.M., van der Sar, A.M., Wang, D., Secombes, C.J., Bird, S., 2015. First demonstration of antigen induced cytokine expression by CD4-1<sup>+</sup> lymphocytes in a poikilotherm: studies in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One* 10, e0126378.
- Zaccone, G., Kapoor, B.G., Fasulo, S., Ainis, L., 2001. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. *Adv Mar Biol* 40, 253-276.
- Zapata, A., 1981. Lymphoid organs of teleost fish. I. Ultrastructure of the thymus of *Rutilus rutilus*. *Dev Comp Immunol* 5, 427-436.

- Zapata, A.G., Torroba, M., Vicente, A., Varas, A., Sacedon, R., Jimenez, E., 1995. The relevance of cell microenvironments for the appearance of lympho-haemopoietic tissues in primitive vertebrates. *Histol Histopathol* 10, 761-778.
- Zhang, D.C., Shao, Y.Q., Huang, Y.Q., Jiang, S.G., 2005. Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the zebrafish (*Danio rerio*). *J Biochem Mol Biol* 38, 571-576.
- Zhang, N., Zhang, X.J., Chen, D.D., Oriol Sunyer, J., Zhang, Y.A., 2017. Molecular characterization and expression analysis of three subclasses of IgT in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 70, 94-105.
- Zhang, Y.A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol* 11, 827-835.
- Zhang, Y.B., Li, Q., Gui, J.F., 2004. Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon. *Immunogenetics* 56, 68-75.
- Zhao, J.G., Zhou, L., Jin, J.Y., Zhao, Z., Lan, J., Zhang, Y.B., Zhang, Q.Y., Gui, J.F., 2009. Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF-kappaB and Sp1 of a medaka beta-defensin. *Dev Comp Immunol* 33, 624-637.
- Zhou, Z., He, S., Liu, Y., Cao, Y., Meng, K., Yao, B., Ringo, E., Yoon, I., 2011. Gut microbial status induced by antibiotic growth promoter alters the prebiotic effects of dietary DVAQUA(R) on *Aeromonas hydrophila*-infected tilapia: production, intestinal bacterial community and non-specific immunity. *Vet Microbiol* 149, 399-405.
- Zhu, L.Y., Lin, A.F., Shao, T., Nie, L., Dong, W.R., Xiang, L.X., Shao, J.Z., 2014. B cells in teleost fish act as pivotal initiating APCs in priming adaptive immunity: an evolutionary perspective on the origin of the B-1 cell subset and B7 molecules. *J Immunol* 192, 2699-2714.
- Zilberg, D., Klesius, P.H., 1997. Quantification of immunoglobulin in the serum and mucus of channel catfish at different ages and following infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Vet Immunol Immunopathol* 58, 171-180.
- Zlotnik, A., 2006. Chemokines and cancer. *Int J Cancer* 119, 2026-2029.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.
- Zou, J., Bird, S., Truckle, J., Bols, N., Horne, M., Secombes, C., 2004. Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Eur J Biochem* 271, 1913-1923.
- Zou, J., Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J.M., Yoshiura, Y., Bols, N., Secombes, C., 2005. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J Immunol* 175, 2484-2494.
- Zou, J., Clark, M.S., Secombes, C.J., 2003a. Characterisation, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, *Fugu rubripes*. *Immunogenetics* 55, 325-335.



- Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N.C., Ellis, A.E., Secombes, C.J., 2003b. Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Dev Comp Immunol 27, 813-822.
- Zou, J., Secombes, C.J., 2011. Teleost fish interferons and their role in immunity. Dev Comp Immunol 35, 1376-1387.
- Zou, J., Secombes, C.J., 2016. The Function of Fish Cytokines. Biology (Basel) 5.
- Zou, J., Tafalla, C., Truckle, J., Secombes, C., 2007. Identification of a second group of type I interferons in fish sheds light on interferon evolution in vertebrates. J Immunol 179, 3859-3871.
- Zwollo, P., Haines, A., Rosato, P., Gumulak-Smith, J., 2008. Molecular and cellular analysis of B-cell populations in the rainbow trout using Pax5 and immunoglobulin markers. Dev Comp Immunol 32, 1482-1496.
- Zwollo, P., Mott, K., Barr, M., 2010. Comparative analyses of B cell populations in trout kidney and mouse bone marrow: establishing "B cell signatures". Dev Comp Immunol 34, 1291-1299.



## Anexos



## 10.1. Anexo I: Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASC	Células secretoras de anticuerpos
BCR	Receptor de células B
BSA	Albumina de suero bovino
CE	Comunidad Europea
CMMs	Centros melanomacrofágicos
CSF	Factor estimulador de colonias
DCs	Células dendríticas
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAsa	Deoxirribonucleasa
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EU	Unión Europea
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura
FCS	Suero bovino fetal
FC	Factor de condición
FSC	<i>Forward scatter</i>
Fig	Figura
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GIALT	Tejido linfoide asociado a la branquia
IELs	Linfocitos intraepiteliales

IFN	Interferón
Igs	Inmunoglobulinas
IHNV	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
IL	Interleuquinas
IOE	Organización Mundial de Sanidad Animal
IPNV	Virus de la necrosis pancreática infecciosa
LP	Lámina propia
L-15	Medio Leibovitz 15
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MCP	Proteína quimiotáctica para monocitos
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
NBT	Azul de tetrazolio
NALT	Tejido linfoide nasal
NETs	Trampas extracelulares neutrofílicas
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NKs	Células asesinas naturales o <i>natural killer</i>
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PHA	Fitohemaglutinina
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PD	Enfermedad del páncreas de salmón
PKR	Proteína kinasa R
PSD	<i>Puffy skin disease</i>
RT	Temperatura ambiente
SALT	Tejido linfoide asociado a la piel
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	<i>Side scatter</i>
Tc	Células T citotóxicas
TCID <sub>50</sub>	Dosis infectiva citotóxica al 50%
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Células T cooperadoras
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Treg	Células T reguladoras
VHSV	Virus de la septicemia hemorrágica viral





## 10.2. Anexo II: Índice de figuras

Figura 1. Morfología del VHSV.

Figura 2. Signos clínicos de la enfermedad provocada por el VHSV en trucha arcoíris.

Figura 3. Fotografía microscópica de las líneas celulares utilizadas en este Tesis.

Figura 4. Tejidos muestreados de trucha arcoíris.

Figura 5. Secciones de piel muestreadas en este estudio.

Figura 6. Niveles de transcripción de quimioquinas en las diferentes secciones de la piel.

Figura 7: Niveles de transcripción de inmunoglobulinas en las diferentes secciones de la piel.

Figura 8. Niveles de transcripción de genes relacionados con la actividad de células T en las diferentes secciones de la piel.

Figura 9. Distribución de células CD3<sup>+</sup> en las zonas anterior y posterior de la piel.

Figura 10. Cuantificación de células CD8<sup>+</sup> en las secciones anterior y posterior de la piel.

Figura 11. Comparación de la transcripción de genes relacionados con la actividad de células T en bazo y piel.

Figura 12. Niveles de transcripción de genes inmunitarios característicos de linfocitos T en la piel en respuesta a VHSV.

Figura 13. Niveles de transcripción de genes inmunitarios característicos de linfocitos T en el bazo en respuesta a VHSV.

Figura 14. Zonas de piel de rodaballo analizadas en el estudio.

Figura 15. Niveles de transcripción de genes inmunitarios en la piel de rodaballo.

Figura 16. Factor de condición de los peces utilizados en este experimento.

Figura 17. Niveles de transcripción de IgM en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 18. Niveles de transcripción de IgT en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 19. Niveles de transcripción de IgD en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 20. Niveles de transcripción de Mx en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 21. Niveles de transcripción de IFN1 en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 22. Niveles de transcripción de IFN- $\gamma$  en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 23. Niveles de transcripción de IL-8 en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 24. Niveles de transcripción de perforina en riñón, intestino, branquia y piel de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 25. Niveles de transcripción de la proteína G de VHSV en el riñón, bazo, intestino y branquia de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 26. Título de IgM en el suero de peces alimentados con Protec<sup>TM</sup>.

Figura 27. Viabilidad celular de RTS11 con diferentes dosis de vitamina C.

Figura 28. Viabilidad celular de leucocitos de riñón con diferentes dosis de vitamina C.

Figura 29. Estallido respiratorio de células RTS11 y leucocitos de riñón en respuesta a vitamina C

Figura 30. Análisis del efecto de vitamina C en la capacidad fagocítica de células RTS11.

Figura 31. Análisis del efecto de vitamina C en la capacidad fagocítica de leucocitos de riñón.

Figura 32. Efecto de la co-incubación con vitamina C en la capacidad fagocítica de diferentes subpoblaciones de leucocitos de riñón.

Figura 33. Efecto de la pre-incubación con vitamina C en la capacidad fagocítica de diferentes subpoblaciones de leucocitos de riñón.

Figura 34. Efecto de la vitamina C en los niveles de expresión de MHC II.

Figura 35. Efecto de la vitamina C en la capacidad migratoria de células RTS11 y leucocitos de riñón hacia CK9.

Figura 36. Efecto de la vitamina C en la transcripción de genes inmunitarios de células RTS11 en respuesta a *E. coli*.

Figura 37. Efecto de la vitamina C en la transcripción de genes inmunitarios de leucocitos de riñón en respuesta a *E. coli*.



### **10.3. Anexo III: Índice de tablas**

Tabla 1. Inmunostimulantes utilizados comúnmente en acuicultura

Tabla 2. Cebadores utilizados para ver la expresión génica en trucha arcoíris

Tabla 3. Cebadores utilizados para ver la expresión génica en rodaballo



## 10.4. Anexo IV: Lista de publicaciones

### Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral:

1. **Esther Leal**, Aitor G. Granja, Carlos Zarza, Carolina Tafalla. Distribution of T cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin and responsiveness to viral infection. PLoS One 2016; 11(1):e0147477. DOI: 10.1371/journal.pone.0147477.
2. Carolina Tafalla, **Esther Leal**, Takuya Yamaguchi, Uwe Fischer. T cell immunity in the teleost digestive tract. Developmental and Comparative Immunology 2016; 64:167-77. DOI: 10.1016/j.dci.2016.02.019
3. **Esther Leal**, Carlos Zarza, Carolina Tafalla. Effect of vitamin C on innate immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. Enviado a Fish & Shellfish Immunology.

### Otras publicaciones:

1. Aitor G. Granja, **Esther Leal**, Jaime Pignatelli, Rosario Castro, Beatriz Abós, Goshi Kato, Uwe Fischer, Carolina Tafalla. Identification of teleost skin CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic-like cells, representing a potential common ancestor for mammalian cross-presenting dendritic cells. Journal of Immunology 2015; 195(4):1825-37. DOI: 10.4049/jimmunol.1500322.
2. Beatriz Abós, Tiehui Wang, Rosario Castro, Aitor G. Granja, **Esther Leal**, Jeffrey Havixbeck, Alfonso Luque, Daniel R. Barreda, Christopher J. Secombes, Carolina Tafalla. Distinct differentiation programs triggered by IL-6 and LPS in teleost IgM<sup>+</sup> B cells in the absence of germinal centers. Scientific Reports 2016; 6:30004. DOI: 10.1038/srep30004.
3. Ronan N. Rouxel, Carolina Tafalla, Emilie Mérour, **Esther Leal**, Stephane Biacchesi, Michel Brémont. Attenuated infectious hematopoietic necrosis virus with rearranged gene order as potential vaccine. Journal of Virology 2016; 90(23):10857-10866.



Caracterización de la respuesta  
inmunitaria en mucosas y su  
modulación a través de la dieta  
en trucha arcoíris  
(*Oncorhynchus mykiss*)

